

**Bindung von Adeninnukleotiden an die Cytochrom c Oxidase  
und deren Regulation der Enzymaktivität**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps - Universität Marburg  
vorgelegt von

Jörg Napiwotzki  
aus Flensburg

Marburg / Lahn 1997

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps - Universität Marburg als Dissertation am                   angenommen.

Erstgutachter:                   Prof. Dr. B. Kadenbach

Zweitgutachter:               Prof. Dr. H. Kindl

Tag der mündlichen Prüfung am 29. 10. 1997

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1995 bis September 1997 im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Kadenbach im Fachbereich Chemie der Philipps - Universität Marburg, angefertigt.

*Meinen Eltern*

# Inhaltsangabe

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1.	Die Cytochrom c Oxidase	5
1.2.	Die Funktion der mitochondrial kodierten Untereinheiten	8
1.3.	Funktion und Bedeutung der kernkodierten Untereinheiten	12
1.4.	Nukleotide als Effektoren der COX	16
1.5.	Zielsetzung	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Material	20
2.2.	Isolierung von Mitochondrien	23
2.3.	Isolierung von COX aus Mitochondrien nach der Triton Methode	24
2.4.	Isolierung von COX nach Yoshikawa	26
2.5.	Proteinbestimmung nach Bradford	29
2.6.	Proteinbestimmung nach Biuret	30
2.7.	Spektroskopische Methoden	31
2.7.1	Differenzspektren	31
2.7.2	Absolutspektren	32
2.7.3	Fluoreszenzspektren	32
2.8	Proteolytische Spaltung der COX durch Trypsin	34
2.9	Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS - PAGE)	35
2.10	Reinigung von monoklonalen IgG	37
2.11	ELISA	38
2.12	Reinigung von Asolectin	40
2.13	Reinigung des Amberlites XAD-2	40
2.14	Herstellung von Proteoliposomen	40
2.15	Polarographischer Enzymtest	41
2.16	Darstellung von [ $^{35}\text{S}$ ]ADP $\alpha$ S aus [ $^{35}\text{S}$ ]ATP $\alpha$ S	42
2.16.1	Papierchromatografie und Autoradiografie	
	zur Kontrolle der Synthese von [ $^{35}\text{S}$ ]ADP $\alpha$ S	43
2.17	Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Nukleotiden	44

2.17.1 Filtermethode .....	44
2.17.2 Kalibrierung .....	45
2.17.3 Gleichgewichtsdialyse .....	46
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1 Bindungsstudien mit TNP-ATP .....	47
3.1.1 Messung von Cytochrome c Oxidase .....	47
3.1.2 Auswertung .....	49
3.1.3 Beeinflussung der Bindungsstellen durch äußere Effektoren. ....	52
3.1.4 Einfluß eines Antikörpers gegen die Untereinheit VIa-H, VIc auf die Bindung von TNP-ATP ..	53
3.1.5 Konkurrenz der TNP-ATP Bindung durch ADP .....	54
3.2 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen mittels Filtermethode .....	56
3.2.1 Bestimmung der ATP - Bindungsstellen .....	56
3.2.2 Bestimmung der ADP - Bindungsstellen .....	58
3.3 Untersuchung der Bindungsstellen mittels Gleichgewichtsdialyse .....	60
3.3.1 Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung .....	60
3.3.2 Zeitabhängigkeit der Bindung von ATP an COX .....	61
3.3.3 Messung der ATP - und ADP - Bindungsstellen .....	62
3.3.4 Konkurrenz der ATP - und ADP - Bindungsstellen .....	64
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Bindungsstudien .....	70
3.5 Photometrische Untersuchungen von Nukleotideffekten .....	72
3.5.1 Wirkung von ATP und ADP auf das Spektrum der COX .....	72
3.5.2 Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Nukleotideffekte .....	74
3.5.3 Untersuchung der Wirkung anderer Nukleotide .....	75
3.5.4 Bestimmung der Spezifität von ADP und IDP .....	76
3.5.5 Abhängigkeit der Nukleotideffekte von der Ionenstärke .....	77
3.5.6 Untersuchung der Nukleotideffekte in Tween 80 .....	78
3.5.7 Wirkung anderer Effektoren auf spektrale Änderungen der $\gamma$ -Bande .....	79
3.5.8 Untersuchung der Wirkung der absoluten ADP - Konzentration .....	81
3.5.9 Nukleotideffekte am reduzierten Enzym .....	83
3.6 Wirkung von Nukleotiden auf die Aktivität des löslichen Enzyms .....	86
3.6.1 Abhängigkeit vom Detergenz .....	86
3.6.2 Einfluß des Nukleotidverhältnisses auf die Aktivität der COX .....	90
3.6.3 Einfluß der Inkubationszeit auf die Stimulierung der Aktivität .....	91
3.6.4 Abhängigkeit der Aktivität der COX von der Pufferzusammensetzung .....	92
3.6.5 Aktivitätsmessungen in Gegenwart von TMPD .....	97
3.6.6 Einfluß von monoklonalen Antikörpern auf die Aktivität in Gegenwart von Nukleotiden .....	99

3.7	Wirkung von Nukleotiden auf das rekonstituierte Enzym .....	102
3.7.1	<i>Bestimmung der Atmungsrate .....</i>	<i>102</i>
3.7.2	<i>Wirkung eines Antikörpers gegen die Untereinheit IV auf die gekoppelte Atmung .....</i>	<i>106</i>
3.7.3	<i>Wirkung eines Antikörpers gegen die Untereinheit VIa-H, VIc auf die gekoppelte Atmung ..</i>	<i>108</i>
3.8	Zusammenfassung der Aktivitätsuntersuchungen .....	112
3.9	Theoretische Suche nach Bindungsstellen .....	114
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>121</b>
4.1	Untersuchungen zur Bestimmung von ATP- und ADP-Bindungsstellen .....	121
4.2	Funktionelle Bedeutungen der Nukleotidbindungsstellen der COX .....	125
4.3	Lage der Nukleotidbindungsstellen .....	131
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>139</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>155</b>
A	Abkürzungen .....	155
B	Computerprogramm zur Suche nach Sequenzhomologien .....	156

# 1 Einleitung

Veränderungen der Biosphäre der Erde, wie z.B. die Abnahme der Durchschnittstemperatur auf der Oberfläche, Zunahme der UV-Einstrahlung, haben in der Natur immer wieder zu Anpassungen der Lebensformen geführt. Eine besondere Anforderung an die Organismen war der Anstieg des Sauerstoffgehaltes in der Atmosphäre. Die Natur hat dabei im Verlaufe der Evolution nicht nur eine Möglichkeit geschaffen, wie das potentielle Zellgift unschädlich gemacht werden kann, sondern die Organismen nutzen dabei das Oxidationspotential des Sauerstoffs zur Gewinnung von Energie. Daß dieser Weg der Energieversorgung sich bereits früh in der Evolution etablierte, zeigt sich daran, daß sowohl Pflanzen als auch Bakterien, Vögel, Fische und Säugetiere im Prinzip denselben Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung dabei benutzen. Vermutlich machte erst der große Energiegewinn, den die verschiedenen Organismen durch den Sauerstoffverbrauch erhielten, die Ausbildung komplexer Lebensformen möglich. Erzeugt die Umsetzung von Glukose unter anaeroben Bedingungen lediglich 2 Moleküle ATP, das als zellulärer Energieträger dient, pro Moleküle Glukose, so werden unter aeroben Bedingungen 36 Moleküle ATP gewonnen.

Möglich wird dies dadurch, daß viele Organismen eine Atmungskette ausgebildet haben. Die Atmungskette ist bei Eukaryoten in der Membran der Mitochondrien innerhalb einer Zelle lokalisiert und besteht aus vier Enzymkomplexen. Diese Enzyme übertragen in einer Kettenreaktion Elektronen von NADH (oder  $\text{FADH}_2$ ) auf Sauerstoff, wobei Wasser entsteht (Tabelle 1). Gleichzeitig transportieren 3 Enzymkomplexe der Atmungskette Protonen aus dem Innermembranraum in das Cytosol und erzeugen so einen Protonengradienten über der Mitochondrienmembran.

**Tabelle 1:** Die elektronenübertragenden Enzyme der Atmungskette

Enzym	Elektronendonator	Elektronenakzeptor	Anzahl translozierter Protonen pro Elektron
NADH-CoQ-Oxidoreduktase	NADH	Ubichinon	2
Succinat-CoQ-Oxidoreduktase	Succinat	Ubichinon	0
CoQ-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (bc <sub>1</sub> - Komplex)	Ubichinon	Cytochrom c	1
Cytochrom c Oxidase	Cytochrom c	Sauerstoff	0.5 - 1



Dieser Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Gewinnung von ATP genutzt. Neben der Photosynthese ist die oxidative Phosphorylierung die effektivste Form der Energieerzeugung, die in der Natur vorkommt.

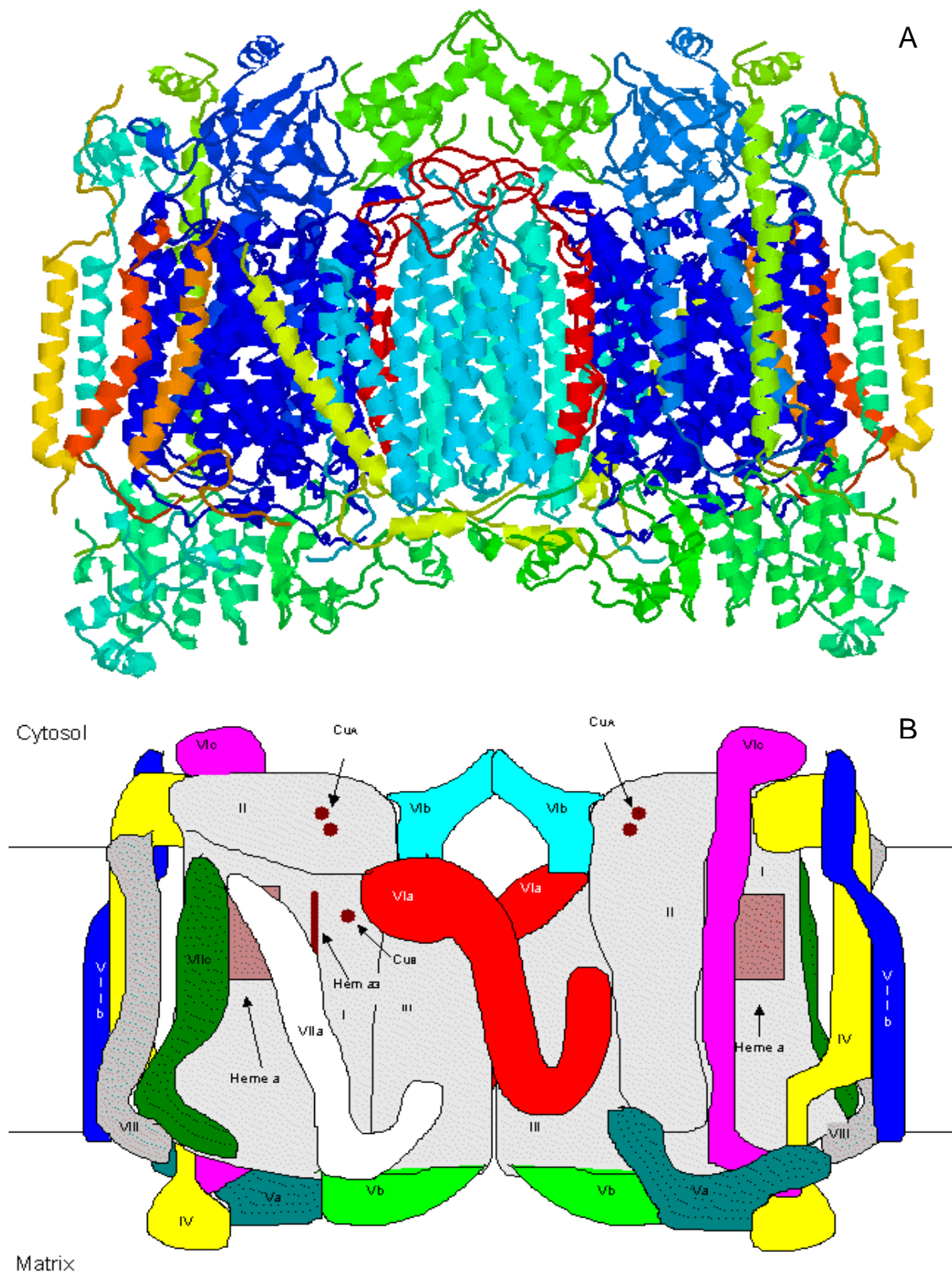
## 1.1 Die Cytochrom c Oxidase

Die Cytochrom c Oxidase gehört zur Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen (Saraste, 1990) und überträgt die Elektronen vom Cytochrom c auf Sauerstoff, der mit vier Protonen aus der mitochondrialen Matrix zu Wasser reagiert. Gleichzeitig pumpt das Enzym Protonen über die Mitochondrienmembran:



Den durch die Atmungskette über der Mitochondrienmembran entstehenden Protonengradienten nutzt die ATP-Synthase zur Regenerierung von ATP aus ADP und  $\text{P}_i$  (von Jagow and Engel, 1980). Die Anzahl der von der COX translozierten Protonen pro umgesetzten Elektron ist in Prokaryoten konstant 1  $\text{H}^+/\text{e}^-$  (Solioz et al., 1982), während dieses Verhältnis in Säugetieren variabel ist (Papa et al., 1991, Capitanio et al., 1991, Frank and Kadenbach, 1996).

Obwohl sich die Funktion der COX evolutionär seit Jahrmillionen nicht verändert hat und in vielen verschiedenen Spezies wie z.B. Pflanzen, Bakterien, Vögeln und Säugern die gleiche Aufgabe hat, ist die Struktur des Enzyms in diesen Organismen sehr verschieden. In Prokaryoten enthält COX 3 - 4 Untereinheiten, während die Anzahl der Untereinheiten in Eukaryoten stark variieren kann. COX aus *Dictyostelium discoideum* ist aus 7 Untereinheiten aufgebaut (Bisson and Schiavo, 1986, Rizzuto et al., 1991), in COX aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) findet man 11 Untereinheiten, während die COX des Insekts *Crithidia fasciculata* aus mindestens 10 Untereinheiten aufgebaut ist (Speijer et al., 1996). Die COX von Fischen und Säugetieren besteht aus 13 Untereinheiten (Kadenbach and Merle, 1981, Kadenbach, 1983, Arnold et al., 1997). Durch die verschiedene Anzahl von Untereinheiten hat das Enzym in den unterschiedlichen Spezies verschiedene Massen. Während COX aus *Paracoccus denitrificans*, das 4 Untereinheiten enthält, lediglich eine Masse von 130 kDa hat, so besitzt das 13 Untereinheiten Enzym aus Rind eine Masse von 204 kDa (Figur 1). In einigen Organismen, wie z.B. Hammerhai, liegt das native Enzym als Monomer vor (Darley - Usmar et al., 1981), in Säugetieren dagegen, wie z.B. Rind, ist das Dimer die aktive Form des Enzyms (Blenkissop et al., 1996, Arnold and Kadenbach, 1997).



**Figur 1:** Die Struktur der COX aus Rinderherz. A) Wiedergabe der  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattbereiche der COX. B) Schematische Darstellung der Struktur der COX. Zur Erstellung der Figur wurden die Daten aus Tsukihara et al. (1995, 1996) benutzt.

Die drei großen Untereinheiten in Eukaryoten, die homolog zu den drei Untereinheiten in Prokaryoten sind, werden vom mitochondrialen Genom kodiert. Diese drei Untereinheiten beinhalten alle katalytisch aktiven Zentren sowie die Bindungsstelle für Cytochrom c. Alle restlichen Untereinheiten werden vom Nukleus kodiert und in die Mitochondrienmembran transportiert.

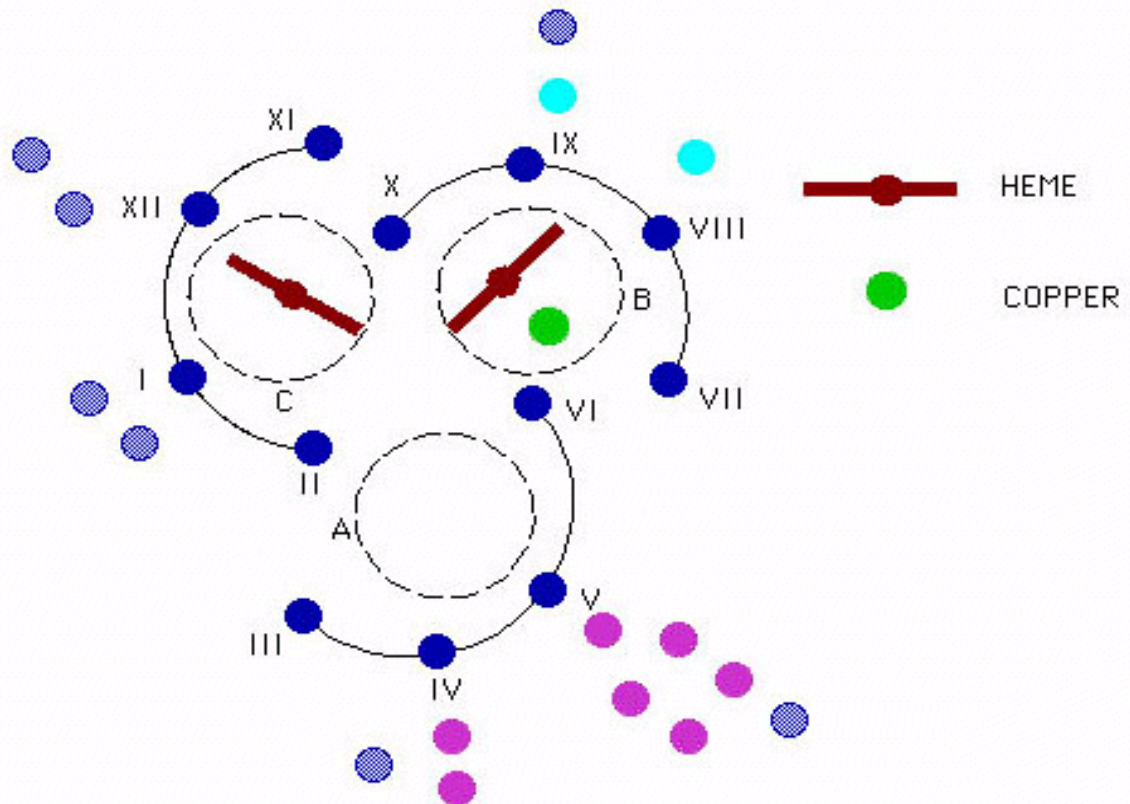
Allen Eukaryoten gemein ist die Ausbildung von Isoformen spezieller Untereinheiten. Während die Expression von Isoformen in den niederen Eukaryoten durch Wirkung äußerer Einflüsse, wie z.B. der Sauerstoffgehalt der Umgebung, geregelt wird (Schiavo and Bisson, 1989, Poyton and Burke, 1992), kommt es in den höheren Eukaryoten zur gewebespezifischen und altersabhängigen Ausbildung der Isoformen (Kadenbach et al., 1987, Capaldi 1990, Taanman et al., 1992), wobei die gebildeten Isozyme unterschiedliche Atmungsraten aufweisen (Merle and Kadenbach, 1982). In allen Fällen jedoch findet die Regulation bereits auf genetischer Ebene statt. Dies geschieht dadurch, dass die Gene der Isoformen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren haben und so nach Bedarf oder Gewebe aktiviert werden können (Taanman et al., 1992, Mell et al., 1994, Wan and Moreadith, 1995).

## 1.2 Die Funktion der mitochondrial kodierten Untereinheiten

In den letzten Jahren sind die Kristallstrukturen der COX aus *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995) und Rinderherz (Tsukihara et al., 1995) aufgeklärt worden. Dabei konnte die Zusammensetzung der Rinderherz-COX aus 13 Untereinheiten ebenso bestätigt werden, wie der Befund, das Rinderherz-COX als Dimer vorliegt (Hakvoort et al., 1987, Blenkinsop et al., 1996).

Die drei mitochondrialkodierten Untereinheiten der COX aus Eukaryoten besitzen große Homologien zu den drei großen Untereinheiten in Prokaryoten. Die Untereinheit I besteht aus zwölf transmembranen Helices und enthält die katalytischen Zentren (Häm a, Häm a<sub>3</sub> sowie Cu<sub>B</sub>), an denen die Elektronen auf den Sauerstoff unter Wasserbildung übertragen werden, sowie ein Magnesiumzentrum, über dessen Bedeutung noch nichts bekannt ist. Zusätzlich enthält die Untereinheit I auch die Protonenkanäle, sowohl den skalaren, der die Protonen, die an den Sauerstoff gebunden werden, als auch den vektoriellen Kanal, der Protonen über die Membran zur Ausbildung des Protonengradienten transportiert. In der schematischen Darstellung der COX in Figur 2 sind die drei Kanäle, die die Helices der Untereinheit I bilden, zu sehen. In zwei der Kanäle ist je eine der beiden Hämgruppen lokalisiert (Pore B und C in Figur 2).

Der skalare Protonenkanal wird vermutlich von den Helices 6 und 8 der Untereinheit I gebildet (Pore B in Figur 2). Die Bedeutung der Aminosäuren Thr 316 und Lys 319 der Helix 8 wird dabei von Hosler et al. (1996) bestätigt. Es konnte gezeigt werden, daß die analogen Aminosäuren in *Rhodobacter sphaeroides* (Thr 359 und Lys 362) für die Aktivität der COX essentiell sind, da in entsprechenden Mutanten die Aktivität der COX drastisch reduziert war. Gleiches wird auch für das Enzym aus *Escherichia coli* beschrieben (Thomas et al., 1993). Zwei mögliche Kanäle für vektorielle Protonen werden von den Helices 3 und 4 (Pore A) sowie 11 und 12 (Pore C) der Untereinheit I gebildet (Tsukihara et al., 1996, Iwata et al., 1995). Das die vektoriellen Protonen über einen anderen Weg durch das Enzym gelangen als die skalaren Protonen zum Reaktionszentrum, konnte bereits von Thomas et al (1993b) gezeigt werden. Durch Mutagenesexperimente war dabei eine Hemmung der Protonentranslokation beobachtet worden, ohne das die Wasserbildungsrate beeinflusst wurde.



**Figur 2:** Schematische Darstellung der helicalen Bereiche der COX aus Rinderherz. Dunkelblau: Untereinheit I, hellblau: Untereinheit II, violett: Untereinheit III, mittelblau: kernkodierte Untereinheiten, grün:  $\text{Cu}_B$ , braun: Hämzentren. Die Grafik ist nach den Daten von Tsukihara et al. (1996) angefertigt.

Die Untereinheit II enthält als einzige Untereinheit der COX eine ausgeprägte  $\beta$ -Faltblattstruktur sowie zwei transmembrane Helices, die sich in der Nähe der Helices 8 und 9 der Untereinheit I befinden. Auf der Untereinheit II ist das  $\text{Cu}_A$ -Zentrum sowie die Cytochrom c Bindungsstelle lokalisiert, die sich beide auf der cytosolischen Seite befinden (Taha and Ferguson-Miller, 1992). Von der Cytochrom c Bindungsstelle werden die Elektronen auf die Reaktionszentren der Untereinheit I übertragen. Zusätzlich könnte die Untereinheit II an der Ausbildung eines Wasserkanals beteiligt sein. Dieser potentielle Kanal liegt zwischen den Untereinheiten I und II und läßt das von der COX gebildete Wasser vom Häm  $a_3$  auf der cytosolischen Seite der COX aus dem Enzym heraustreten (Tsukihara et al., 1996). Die Aufklärung der Kristallstruktur der COX zeigte, daß das  $\text{Cu}_A$ -Zentrum im Gegensatz zum  $\text{Cu}_B$ -Zentrum aus zwei Kupferatomen besteht (Tsukihara et al., 1995).

Alle für die beschriebenen Reaktionen der COX benötigten Zentren oder Kanäle liegen in den beiden großen Untereinheiten der COX aus Säugetieren. Dies steht auch im Einklang mit Daten über die COX aus *Paracoccus*

*denitrificans*. Von dem nativ vier Untereinheiten enthaltenen Enzym können isolierungsbedingt die beiden kleineren Untereinheiten abdissoziieren. Trotzdem verfügt das Enzym über katalytische Aktivität und ist in der Lage Protonen zu transportieren, so daß ein Membranpotential und Protonengradient entsteht.

Da die beiden großen Untereinheiten bereits alle Reaktionen der COX durchführen (Solioz et al., 1982, Haltia et al., 1991), stellt sich die Frage nach der Funktion und Bedeutung der zusätzlichen Untereinheiten, besonders da die kernkodierten Untereinheiten der COX aus Säugetieren erst während der Evolution hinzukamen.

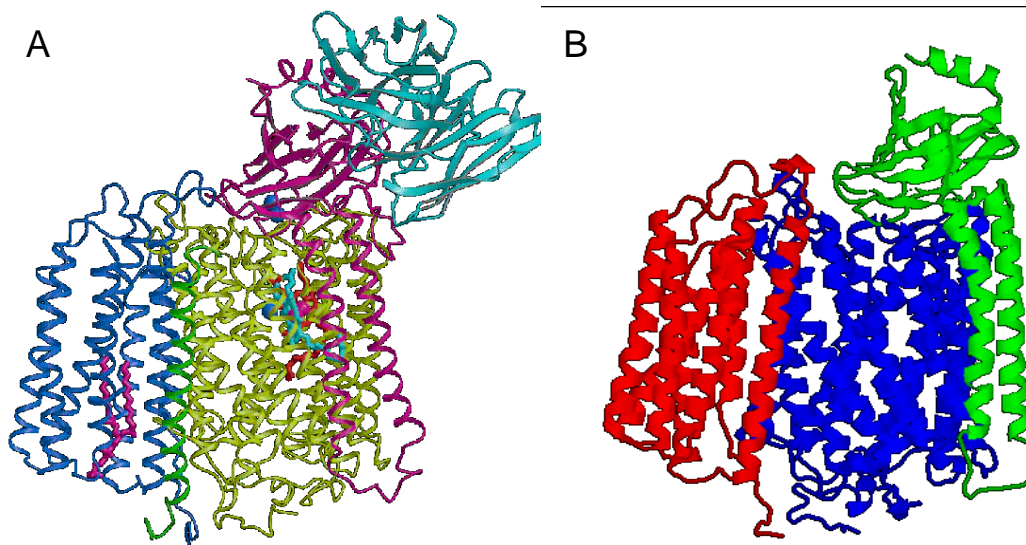
Die Untereinheit III besteht ähnlich wie die Untereinheit I nur aus transmembranen Domänen. Von den insgesamt sieben Helices stehen zwei (Helix 1 und 3) in direktem Kontakt zur Untereinheit I. Obwohl die Helix 3 der Untereinheit III sowie Bereiche der Faltblattstruktur der Untereinheit II mit der Helix 5 der Untereinheit I in Kontakt stehen, gibt es keinerlei direkte Verbindung zwischen den Untereinheiten II und III.

Der Untereinheit III wurde lange Zeit eine Rolle bei der Protonentranslokation zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, daß COX aus Rinderherz, der die Untereinheit III durch Ionenaustauschchromatografie entfernt wird (Saraste et al., 1981, Penttilä, 1983, Prochaska and Fink, 1987), keine Protonenpumpaktivität mehr zeigt, obwohl das Enzym weiterhin Sauerstoff zu Wasser umsetzt (Saraste et al., 1981). Gleichzeitig konnte eine Abnahme des RCR-Wertes, dem Quotienten aus Valinomycin- und CCCP-entkoppelter Atmungsrate durch gekoppelte Atmungsrate, beobachtet werden. Dieser Wert stellt einen Indikator für die Permeabilität der Vesikel für Protonen dar (Penttilä, 1983, Puettner et al., 1985, Sarti et al., 1981). Durch Behandlung von Chymotrypsin werden Teile der Untereinheit III abgebaut (Carroll and Racker, 1977). Gleichzeitig läßt sich eine Abnahme der Protonentranslokation auf etwa die Hälfte beobachten (Puettner et al., 1985, Sarti et al., 1985). Durch die Aufklärung der Struktur erscheinen diese Daten jedoch in einem anderen Licht. Die Untereinheit VIa, die durch gebundene Nukleotide die Protonentranslokation der COX aus Rinderherz beeinflusst (Frank and Kadenbach, 1996), ist an die Untereinheit III gebunden. Durch Entfernen der Untereinheit III wird ebenfalls die Untereinheit VIa von der COX abgelöst. Es ist daher fraglich, welche Untereinheit für die Effekte, die durch Dissoziation der Untereinheit III beobachtet werden, verantwortlich ist.

Der Untereinheit III der COX wird im Säugetierenzym eine Rolle bei der Stabilisierung des Enzymdimers zugeschrieben (Hakvoort et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, daß ein Fehlen der Untereinheit III zur Monomerisierung des Dimerkomplexes führt (Penttilä, 1983). Die Strukturdaten der COX aus Rinderherz

lassen darauf schließen, daß auch die Untereinheit VIa bei der Stabilisierung des Dimers beteiligt ist (Tsukihara et al., 1996).

Die drei großen Untereinheiten der COX, das „Core - Protein“, haben sich in der Evolution sowohl in der Funktion wie auch in der Struktur nur unwesentlich verändert (Figur 3). Lediglich die Bindungsstelle für Cytochrom c auf der Untereinheit II hat sich im Verlauf der evolutionären Entwicklung verändert (Brown et al., 1982, Wallace et al., 1987).



**Figur 3:** Vergleich der Strukturen von COX aus *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995) und den drei großen Untereinheiten der COX aus Rinderherz (Tsukihara et al., 1996). A) COX aus *Paracoccus denitrificans*: Untereinheit I: gelb, Untereinheit II: violett, Untereinheit III: blau, Untereinheit IV: grün. Die hellblau dargestellte Faltblattstruktur am rechten oberen Bildrand ist Bestandteil des Antikörpers, in dessen Gegenwart die Kristallisation stattfand. In Untereinheit III wurde ein fest gebundenes Phospholipid (violett) lokalisiert. B) Die mitochondrialcodierten Untereinheiten der COX aus Rinderherz. Untereinheit I: blau, Untereinheit II: grün, Untereinheit III: rot.



### 1.3 Funktion und Bedeutung der kernkodierte Untereinheiten der COX

Allen kernkodierte Untereinheiten der COX gemein ist, daß sie kleiner sind als die mitochondrial kodierten. Während die Untereinheiten IV, VIa, VIc, VIIa, VIIb, VIIc und VIII eine transmembrane Helix ausbilden, befinden sich die Untereinheiten Va und Vb auf der zur Matrix orientierten Seite der COX und die Untereinheit VIb auf der cytosolischen Seite. Bei allen transmembranen Untereinheiten befindet sich der N-Terminus auf der innermitochondrialen Seite der COX, so daß eine Einschleusung über die N-terminale Seite der kernkodierte Untereinheiten wahrscheinlich ist.

Die Untereinheit IV ist die größte der kernkodierte Untereinheiten. Die transmembrane Helix verläuft diagonal zu den Helices 11 und 12 der Untereinheit I, während sowohl der cytosolische C-Terminus als auch der mitochondriale N-Terminus über die Untereinheit I herüberraßen und Kontakt mit der Untereinheit II haben. Capitanio et al. (1994) haben gezeigt, daß die Untereinheit IV eine Rolle bei der Protonentranslokation spielt. Durch Behandlung der COX mit verschiedenen Proteasen konnten sie belegen, daß die Anwesenheit der Aminosäuren 5 - 7 (Val - Val - Lys) essentiell für die Protonentranslokation ist. Da jedoch keine sinnvolle Regulation der  $H^+/e^-$ -Stöchiometrie durch das Abspalten von Aminosäuren möglich ist, postulieren Capitanio et al. das diese Aminosäuren beim Transport der Protonen über die Membran beteiligt sind. Zusätzlich zu der Funktion beim Protonentransport sollte die Untereinheit IV auch die Affinität der COX für Cytochrom c beeinflussen können. Dies wird dadurch deutlich, daß Hefe in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration zwei verschiedene Isoformen der Untereinheit V exprimiert. Die Untereinheit V der Hefe entspricht der Untereinheit IV der COX von Säugern. Die unterschiedlichen Isozyme der Hefe-COX haben unterschiedliche Affinitäten für Cytochrom c. Auch die Atmungsraten werden durch die Ausbildung zweier verschiedener Untereinheiten V in Hefe modifiziert (Poyton and Burke, 1992, Allan et al., 1995). Durch die Lage der Untereinheit IV innerhalb der COX ist es möglich, daß die Cytochrom c Bindungsstelle durch den C - Terminus der Untereinheit IV direkt oder indirekt über Wechselwirkungen des N-terminalen Endes der Untereinheit IV und der Untereinheit II beeinflußt werden kann. Die Untereinheit IV wirkt als Bindeglied zwischen der Untereinheit VIIb bzw. der Untereinheit VIII und der Untereinheit I, da diese über die Untereinheit IV an das Protein assoziiert sind (Tsukihara et al., 1996).



Über die Funktion der Untereinheit Va in Rinderherz-COX ist kaum etwas bekannt. Auch hat erst die Aufklärung der Struktur der COX dazu beigetragen, die Lage der Untereinheit endgültig auf der innermitochondrialen Seite der COX zu bestimmen. In früheren Arbeiten wurde die Untereinheit Va als transmembrane Untereinheit beschrieben (Einarsdottir, 1995) oder auf der cytosolischen Seite der COX (Zhang et al., 1991) lokalisiert. Ähnlich wie die Untereinheiten VIIb und VIII ist auch die Untereinheit Va über die Untereinheit IV an das Protein assoziiert. Gleichzeitig besteht Kontakt zur Untereinheit VIc, so daß es möglich ist, daß die Untereinheit Va auf der mitochondrialen Seite der COX unterhalb der Untereinheit I liegt, ohne das eine direkte Bindung zwischen diesen beiden Untereinheiten besteht.

Untereinheit Vb ist ebenso wie die Untereinheit Va eine extramembrane Untereinheit, die auf der mitochondrialen Seite der COX lokalisiert ist. Die Untereinheit Vb ist an die Untereinheiten I und III assoziiert. Zusätzlich besteht ein Berührungspunkt zur Untereinheit Va. Ähnlich wie bei der Untereinheit Va gibt es noch keine klaren Aussagen über die Funktion dieser Untereinheit, jedoch ist bekannt, daß diese Untereinheit ein Zinkatom beinhaltet, das durch vier Cysteine fixiert ist (Härd et al., 1990, Tsukihara et al., 1995).

Untereinheit VIa ist die am besten untersuchte kernkodierte Untereinheit der COX, da es zum einen die größte der isoformspezifischen Untereinheiten ist und zum anderen da von dieser Untereinheit eine Rolle bei der Regulation der Aktivität sowie der Protonentranslokation vermutet wird (Anthony et al., 1993, Rohdich and Kadenbach, 1993, Taanman et al., 1994, Frank and Kadenbach, 1996). Diese Untereinheit ist lediglich mit der Untereinheit III an der COX assoziiert, zum einen steht die transmembrane Helix mit der Helix 4 der Untereinheit III in Kontakt zum anderen ragt der cytosolische Bereich über die transmembranen Helices der Untereinheit III hinüber. Durch Untersuchungen an COX aus Hefenullmutanten, denen die Untereinheit VIa fehlte, konnte gezeigt werden, daß die Aktivität in Abwesenheit der Untereinheit höher ist als bei COX aus Wildtyp-Hefe (Taanman et al., 1994). Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, daß an diese Untereinheit der Hefe ein Molekül TNP-ATP pro Molekül COX bindet. Neben der regulatorischen Funktion wird dieser Untereinheit noch eine Bedeutung bei der Stabilisierung des Enzymdimers zugeschrieben. Die Untereinheit VIa reicht mit dem N-terminalen Bereich der transmembranen Helix sowie dem N-Terminus dicht an die Untereinheit I des anderen Monomers heran. Der N-terminale Bereich steht dabei in engem Kontakt mit den Helices 5 und 7 der Untereinheit I des anderen Monomers (Tsukihara et al., 1996). Dadurch ist es möglich, daß durch die Bindung von Nukleotiden an den innermitochondrialen Bereich der Untereinheit VIa (Frank and Kadenbach, 1996, Tsukihara et al., 1996)

die Aktivität und die Protonentranslokation des anderen Monomers beeinflusst wird. Dies geschieht jedoch ohne daß das ATP wie bei der Adenosintriphosphatase verbraucht wird (Arai et al., 1989).

Die Untereinheit VIb ist ebenso wie die Untereinheit Va und Vb extramembran, liegt jedoch im Gegensatz zu diesen auf der cytosolischen Seite der COX und ist dabei mit den Untereinheiten II und III assoziiert. Sie bildet zusammen mit der Untereinheit VIb des anderen Monomers eine Verbindung zwischen den beiden Monomeren und trägt so zur Stabilität des Dimers bei. Dieser Untereinheit wird eine aktivitätsmindernde Funktion in COX aus Säugetieren zugeschrieben, die niedrigere Atmungsraten aufweisen als die von Prokaryoten (Kadenbach et al., 1991). Dies konnte durch Versuche an Rinderherz-COX gezeigt werden, der durch Gelfiltration die Untereinheit VIb selektiv entfernt wurde (Weishaupt and Kadenbach, 1992). Diese COX hatte deutlich höhere Atmungsraten als Wildtyp COX aus Rinderherz. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die Untereinheit VIb eine Rolle bei der Assemblierung der COX spielt, da Hefemutanten, denen die Untereinheit VIb fehlt nur sehr geringe Mengen an COX bilden (LaMarche et al., 1992).

Die Untereinheit VIIa wird ebenso wie die Untereinheiten VIa und VIII in Säugetieren gewebsspezifisch exprimiert (Kadenbach et al., 1995, Linder et al., 1995). Als einzige kernkodierte Untereinheit hat diese Untereinheit Kontakt mit allen drei mitochondrial kodierten Untereinheiten. Dies wird ermöglicht durch die starke Schräglage der transmembranen Helix relativ zu den übrigen Untereinheiten. Über die Funktion der Untereinheit VIIa ist jedoch noch nichts bekannt. Jedoch ist ein Protein (SIG81) gefunden worden, das hohe Homologien (> 65%) zu der Untereinheit VIIa aufweist (Segade et al., 1996). Interessanterweise ist ein konservierter Sequenzbereich der Untereinheit VIIa (Seelan and Grossman, 1991) auch in SIG81 aus Maus oder Mensch konserviert. Durch Aufklärung der Funktion von SIG81 wird vermutlich auch die Bedeutung der Untereinheit VIIa innerhalb der COX erhellt.

Die Untereinheit VIIb ist über die Untereinheit IV an die COX gebunden und ist am weitesten vom Dimerzentrum entfernt. Es wird eine evolutionäre Verwandtschaft zwischen den Untereinheiten VIIa und VIIb ähnlich wie zwischen VIa und VIc vermutet, da monoklonale Antikörper sowohl an die Untereinheiten VIa und VIc bzw. an die Untereinheiten VIIa und VIIb binden (Schneyder et al., 1991).

Die Untereinheiten VIIc und VIII stehen in engen Kontakt zueinander. Während die Untereinheit VIII direkt über die Untereinheit I mit dem „Core - Protein“ in Kontakt steht, ist die Untereinheit VIIc über die Untereinheiten IV und VIII an das Enzym gebunden. Über die Funktionen dieser Untereinheiten ist nichts bekannt.

Die Untereinheit VIII kommt jedoch in gewebsspezifischen Isoformen vor, so daß eine funktionelle Bedeutung für diese Untereinheit erwartet wird. Es ist die einzige der isoformbildenden Untereinheiten, die in einigen Spezies in Herz und Leber nur in der Leberisoform (Mensch) oder nur in der Herzisoform (Kaninchen, Forelle) vorkommt (Rizzuto et al., 1989, Linder et al., 1995, Grossman and Lomax, 1997).

## 1.4 Nukleotide als Effektoren der COX

Die meisten Reaktionen innerhalb eines Stoffwechselweges laufen reversibel ab und die Reaktionsrichtung wird durch Edukt- und Produktkonzentration reguliert. Die von der COX katalysierte Reaktion, die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser bei gleichzeitiger Erzeugung eines Protonengradienten, ist jedoch stark exergonisch und irreversibel. Für Enzyme, die eine irreversible Reaktion katalysieren, ist in der Regel eine Regulierung bekannt, die verhindert, daß der Organismus Energie verschwendet, indem eine Reaktion durchgeführt wird, obwohl die daraus gewonnene Energie nicht benötigt wird. Auch wird so verhindert, daß zwei irreversible, entgegengesetzte Reaktionswege gleichzeitig ablaufen (z.B. Glykolyse und Glykoneogenese). Eine Hemmung erfolgt dabei häufig, indem das Reaktionsprodukt einer enzymatischen Katalyse diese inhibiert. Diese Produkthemmung ist im Falle der COX nicht möglich, da das Reaktionsprodukt Wasser die im Organismus am häufigsten vorkommende Verbindung ist.

Ein weiterer Weg zur Hemmung von Enzymen ist die Inhibierung durch das Produkt einer Stoffwechselkette. So wie ATP z.B. die Phosphofructokinase als Endprodukt des Glykolysestoffwechsels hemmt, ist auch Regulierung der COX - Aktivität durch ATP denkbar, da der von der COX gebildete Protonengradient zur ATP - Synthese benutzt wird. ATP wird in allen Organismen als Träger von zellulärer Energie benutzt, wobei die gespeicherte Energie durch Hydrolyse des ATP in ADP und anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Das Entstehen von ADP bzw. die Erhöhung des ADP - Levels ist deshalb ein Zeichen für einen Mangel an Energie. Deshalb sollte bei einem Ansteigen des ADP - Levels auch die Aktivität der COX wieder ansteigen, damit die Zelle mehr Energie in Form von ATP bereitstellen kann. Als Bindungsstellen für Nukleotide wurden die kernkodierte Untereinheiten vorgeschlagen, da die enzymatische Aktivität der COX aus Säugetieren deutlich geringer ist als die aus Prokaryoten (Kadenbach, 1986).

Bereits vor über 20 Jahren konnte an Keilin - Hartree - Partikeln gezeigt werden, daß die Aktivität von COX ATP- und ADP-abhängig ist (Ferguson - Miller et al., 1976, Robert and Hess, 1977), dabei reichten bereits kleine Nukleotidkonzentrationen aus, um die Atmungsrate der COX zu beeinflussen. Die Autoren dieser Arbeiten waren sich jedoch nicht sicher, ob Nukleotide eine Wirkung auf das Cytochrom c oder die COX haben. Bisson et al. (1987) und Lin et al. (1995) zeigten durch Untersuchungen von COX, an die  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  oder  $8\text{-N}_3\text{-ATP}$  mittels Photolaffinitätslabeling fixiert wurde, daß die Nukleotide einen

Einfluß auf die Bindungsstelle der COX für Cytochrom c haben. In einer Arbeit von Hüther et al. (1988) wurde gezeigt, daß die Stimulierung rekonstituierter Rinderherz-COX durch Nukleotide abhängig ist von der Konzentration des Nukleotids. Unabhängig davon wird in Gegenwart von ADP immer eine niedrigere  $K_M$  gemessen als in Gegenwart von ATP (Hüther and Kadenbach, 1987). In einer späteren Arbeit konnte jedoch eine geringfügige stärkere Stimulierung der Atmungsraten rekonstituierter Rinderherz-COX durch ADP gegenüber ATP beobachtet werden (Rohdich and Kadenbach, 1993). Zur Stimulierung reichten dabei bereits mikromolare Nukleotidkonzentrationen. Am Enzym aus *Paracoccus denitrificans* war weder eine Stimulierung der Atmungsrate noch die Beeinflussung der Affinität der COX für Cytochrom c durch Nukleotide beobachtbar, hingegen wurde bei COX aus Hefe eine Regulation durch extraliposomale Nukleotide beschrieben (Rigoulet et al., 1987, Prieto et al., 1995). Während Anthony et al. (1993) einen Zusammenhang zwischen der Bindung von ATP an die zur matrixorientierten Seite der Untereinheit VIa-H von COX aus Rinderherz zeigten, bestimmten Taanman et al (1993, 1994) daß die Bindung von ATP auf der cytosolischen Seite der Untereinheit VIa von COX aus Hefe stattfindet. Durch Verwendung von 8- $N_3$ -ATP konnten Lin et al (1995) eine Hemmung der COX-Aktivität um 40 % finden, jedoch ohne eine Änderung der Struktur der reaktiven Zentren im EPR nachweisen zu können.

Neuere Erkenntnisse lassen den Schluß zu, daß durch Nukleotide nicht nur eine Regulation der Atmungsrate der COX erfolgt, sondern auch eine Steuerung der Protonentranslokation (Frank and Kadenbach, 1996). Durch das intraliposomale ATP/ADP-Verhältnis wird dabei je nach Energielevel innerhalb der Zelle entweder mehr Reaktionsenergie zur Erzeugung des Protonengradienten oder zur Gewinnung von Wärme verwendet. Die Lage der Bindungsstelle konnte dabei durch Versuche in Gegenwart eines monoklonalen Antikörpers auf dem N-terminalen Ende der Untereinheit VIa der COX aus Rinderherz lokalisiert werden. Die Protonentranslokation des Leberenzym unterliegt jedoch keiner Regulation durch intraliposomale Nukleotide. Dies erklärt auch die Funktion der gewebsspezifischen Untereinheit VIa in Herz und Leber.

In den letzten Jahren wurden viele Versuche unternommen die Bindung von Nukleotiden an die COX aus Säugetieren nicht nur durch Beobachtungen der Aktivität oder Protonentranslokation zu belegen, sondern indem radioaktivmarkierte Nukleotide direkt an das Enzym fixiert wurden. Zur besseren Durchführung unternahm man diese Fixierung nicht mit ATP oder ADP, sondern mit Nukleotidderivaten, die sich zum einen chemisch an das Enzym binden lassen (2- $N_3$ -ATP oder 8- $N_3$ -ATP) oder mit einem Derivat, das sich besser beobachten läßt (TNP-ATP). Durch die Verwendung der verschiedenen Reagenzien gelang

man zu recht unterschiedlichen Ergebnissen. So wurden teilweise 2 Bindungsstellen beschrieben (Montecucco et al., 1986, Reimann and Kadenbach, 1992, Taanman et al, 1994), teilweise wurden mindestens sechs Untereinheiten markiert (Hüther et al., 1987, Reimann et al., 1988). Durch Verwendung einer Gleichgewichtsdialyse und von radioaktivem ATP konnte von Rieger et al. (1995) die hohe Anzahl von sieben Bindungsstellen in COX aus Rinderherz bestimmt werden, während COX aus Leber nur sechs Bindungsstellen für ATP und COX aus *Paracoccus denitrificans* sogar nur eine Nukleotidbindungsstelle besitzt.

## **1.5 Zielsetzung**

In dieser Dissertation sollte die Anzahl der Nukleotidbindungsstellen der COX am Beispiel der Rinderenzyme bestimmt werden. Zusätzlich sollte die Affinität der Bindung untersucht werden. Die Bindung von Nukleotiden an die COX sollte dabei mittels Fluoreszenzphotometrie, Gleichgewichtsdialyse und einer Filtermethode untersucht werden. Neben der Bestätigung der Anzahl von sieben Bindungsstellen für ATP an COX aus Rinderherz sollte untersucht werden, wieviele ADP-Bindungsstellen dieses Enzym besitzt. Zusätzlich war durch Kompetitionsversuche zu zeigen, ob die Bindungsstellen sowohl ATP als auch ADP binden oder ob es Bindungsstellen gibt, die spezifisch für eines der beiden Adeninnukleotide sind.

In einem zweiten Teil der Arbeit war die Regulation der Atmungsrate der COX durch Adeninnukleotide zu untersuchen, um die Funktion von Nukleotiden als allosterische Effektoren besser zu verstehen. Dabei sollten sowohl am löslichen wie auch am rekonstituierten Enzym Experimente durchgeführt werden. Durch Messungen in Gegenwart von monoklonalen Antikörpern sollten einzelne Bindungsstellen lokalisiert werden und in einen direkten, funktionellen Zusammenhang mit der Regulation der Atmungsrate der COX gebracht werden. Am löslichen Enzym sollte zusätzlich untersucht werden, inwiefern verschiedene Detergenzien, Veränderungen der Ionenstärke oder die Pufferzusammensetzung die Regulation der Atmung durch Nukleotide beeinflusst. Auch war zu bestimmen, ob die Anwesenheit von Magnesiumionen die Nukleotideffekte beeinflusst.

Der dritte Bereich dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Wirkung von Nukleotiden auf das Absolutspektrum der COX. Dabei waren Einflüsse von Detergenzien und Ionenstärken auf die Nukleotideffekte ebenso zu untersuchen wie die Spezifität der Bindung für Adeninnukleotide.

Vor dem Hintergrund, daß Huang and Klingenberg (1995) isolierungsbedingte, kryptische Bindungsstellen an dem Entkopplerprotein des braunen Fettgewebes gefunden haben, sollte untersucht werden, ob die Bindung der Nukleotide zeitabhängig ist und ob ein zeitabhängiges Binden von Nukleotiden durch die Isolierung bedingt ist.

In letzten Teil sollte untersucht werden, ob es durch einfache Homologieregeln möglich ist die Bindungsstellen für Adeninnukleotide mittels einer computergestützten Suche auf einzelne Untereinheiten der COX aus Rinderherz zu lokalisieren.

## 2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. oder speziell für biochemische Untersuchungen gereinigt. Alle während dieser Arbeit hergestellten Puffer und Lösungen wurden mit bidest. Wasser angesetzt.

Experimente, bei denen mit radioaktiv markierten Substanzen gearbeitet wurde, fanden in speziell dafür ausgewiesenen Räumen statt, zu denen nur autorisierte Personen Zutritt hatten. Zur Abschirmung der auftretenden Strahlung wurde eine Schutzscheibe aus Plexiglas eingesetzt. Grundsätzlich wurde Schutzkleidung (Handschuhe, Laborkittel, Schutzbrille) getragen. Entstandene Abfälle wurden nach den verwendeten Isotopen ( $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ) getrennt gesammelt und gemäß den Strahlenschutzbestimmungen entsorgt.

Arbeiten mit gesundheitsgefährdenden Stoffen erfolgten unter einem Abzug. Die anfallenden Abfälle wurden getrennt gesammelt und entsorgt.

### 2.1 Material

#### Organe

Rinderherzen	Schlachthof Marburg
Rinderlebern	Schlachthof Marburg
Rindernieren	Schlachthof Marburg

#### Reagenzien zur Messung der Aktivität von COX

CCCP	Boehringer, Mannheim
Valinomycin	Boehringer, Mannheim
Cytochrom c (Pferdeherz, Typ VI)	Sigma, München



## Nukleotide

ATP, Na <sub>2</sub> -Salz (Grade I: 99 % Reinheit)	Sigma, München
ADP, K-Salz (98 - 100 % Reinheit)	Boehringer, Mannheim
[ <sup>35</sup> S]ATP $\alpha$ S (400 Ci/mol, 10 mCi/ml)	Amersham, Braunschweig
GDP, Na <sub>2</sub> -Salz (ca 98 % Reinheit)	Boehringer, Mannheim
CTP, Na <sub>2</sub> - Salz	Boehringer, Mannheim
CDP, Na <sub>3</sub> - Salz	Boehringer, Mannheim
ITP, Na <sub>3</sub> -Salz	Boehringer, Mannheim
IDP, Na <sub>3</sub> - Salz	Boehringer, Mannheim
UTP, Na <sub>3</sub> - Salz	Boehringer, Mannheim
dATP, Na <sub>2</sub> - Salz	Boehringer, Mannheim
2'(3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-ATP (TNP-ATP)	Arbeitskreis Kadenbach

## Säulen- und Filtermaterialien

Protein A Sepharose 4B, Fast Flow	Pharmacia, Freiburg
DEAE - Sephacel	Pharmacia, Freiburg
Centricon TM 30 Microconcentrator	Amicon, Witten
Ultrafiltrationsmembran aus Polysulfon (100.000 Da, 25 mm Ø)	Sartorius, Göttingen
XAD-2	Serva, Heidelberg

## Enzyme

Cytochrom c Oxidase aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	Prof. Dr. B. Ludwig, Frankfurt / Main
---	--

## Detergenzien

Brij-35	Fluka, Deisenhofen
Natriumcholat	Serva, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
Triton X-114	Serva, Heidelberg

Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Tween 80	Serva, Heidelberg
Laurylmaltosid (Na-Salz)	Biomol, Hamburg
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin, Typ II (Asolectin)	Sigma, München

### **Sonstige Chemikalien**

Coomassie brilliant blue (Serva Blue R250)	Serva, Heidelberg
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe

Soweit nicht anders aufgelistet, wurden die benutzen Reagenzien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisendorf), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Pharmazia (Freiburg) bezogen.

## Methoden

### 2.2 Isolierung von Mitochondrien

Puffer A:	250 mM	Saccharose	
	100 mM	Kaliumphosphat	pH 9,0
	1 mM	EDTA	
Puffer B:	250 mM	Saccharose	
	10 mM	Tris-HCl	pH 7,6
Tris-Lösung:	2 M	Tris	

Zur Isolierung der Mitochondrien wurde die Methode der fraktionierenden Zentrifugation verwendet (Smith, 1967).

#### Isolierung aus Rinderherz

Das möglichst frische Herz wurde auf Eis gelagert transportiert und anschließend im Kühlraum bei 4°C verarbeitet. Das Fleisch wurde sorgfältig von Fett und Sehnen befreit und in Stücke geschnitten. Diese Stücke konnten sofort weiterverwendet werden oder aber bei -80°C gelagert werden, mußten dann vor ihrer Verwendung über Nacht bei 4° C aufgetaut werden.

Die Fleischstücke wurden durch einen Fleischwolf gedreht, in Portionen von etwa 150 g mit 750 mL Puffer A in einen Waring Blendor gegeben und sechsmal für 10-20 s homogenisiert. Die Gründlichkeit dieses Schrittes war entscheidend für die spätere Ausbeute an Mitochondrien und COX.

Der pH-Wert wurde kontrolliert und mit Tris-Lösung auf pH 7.6-7.8 eingestellt. Das entstandene Homogenat wurde für 10 min bei 2000 rpm in einem JA-10 Rotor zentrifugiert und der Überstand anschließend durch ein feines Tuch filtriert. Der Rückstand wurde mit dem vierfachen Volumen Puffer B versetzt, erneut im Waring Blender homogenisiert, zentrifugiert und durch das Tuch filtriert. Aus den gesammelten Überständen wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation im JA-10 Rotor bei 9000 rpm für 20 min sedimentiert.

Zum Waschen der Pellets wurden sie im fünffachen Volumen Puffer B resuspendiert und mit einem Teflonstempel homogenisiert. Die Abtrennung von Myosin und Actin-Filamenten fand durch erneute Zentrifugation statt (JA-10

Rotor, 1500 rpm, 10 min). Aus dem Überstand pelletierten die Mitochondrien durch Abzentrifugation (JA-10 Rotor, 9000 rpm, 20 min). Falls der Überstand noch sehr trüb war, erfolgte eine erneute Zentrifugation. Die Mitochondrien wurden im Verhältnis 1 : 1 mit Puffer B versetzt und gepottet. Die Mitochondrien konnten sofort weiterverwendet werden, um COX zu isolieren oder aber bei -80°C eingefroren werden.

### Isolierung aus Rinderleber und Rinderniere

Die Isolierung der COX aus Rinderleber und Rinderniere erfolgte analog der Isolierung aus Rinderherz mit zwei Modifikationen. Die Zerkleinerung des Fleisches mit dem Fleischwolf entfiel bei Isolierung aus Rinderleber. Zusätzlich mußte der letzte Waschschrift mehrmals wiederholt werden. Die Ausbeute an Mitochondrien war niedriger als bei der Isolierung aus Rinderherz.

## 2.3 Isolierung von COX aus Mitochondrien nach der Triton Methode

KCl - Lösung :	1 M 10 mM	KCl Tris-HCl	pH 7.2
Tris - Lösung:	10 mM	Tris-HCl	pH 7.2
Triton X-114 Lösung:	20 %	Triton X-114 (w/v)	
Puffer B:	250 mM 10 mM	Saccharose Tris-HCl	pH 7.2
Puffer C:	200 mM 10 mM	KCl Tris-HCl	pH 7.2
Puffer D:	200 mM 10 mM 5 %	KCl Tris-HCl Triton X-100 (w/v)	pH 7.2
Puffer E:	10 mM 0,1 %	Tris-HCl Triton X-100 (w/v)	pH 7.2

Puffer F:	200 mM	NaCl	pH 7.2
	10 mM	Tris-HCl	
	0,1 %	Triton X-100 (w/v)	

Ammoniumsulfat- lösung:	3,8 M	Ammoniumsulfat (NH <sub>3</sub> )pH 7.4
----------------------------	-------	---

Die Cytochrom c Oxidase wurde aus den Mitochondrien isoliert, indem die Membran- und Matrixproteine durch Behandlung mit nichtionischen Detergenzien extrahiert wurden (Jacobs et al., 1966, Kadenbach et al., 1986). Anschließend fand eine Aufreinigung durch Säulenchromatographie und fraktionierter Ammoniumsulfatfällung statt. Alle Arbeiten erfolgten bei 4°C. Nach den einzelnen Schritten wurde der Häm aa<sub>3</sub> - Gehalt jeder Probe photometrisch (Differenzspektrum dithionitreduziert - luftoxidiert) überprüft.

Etwa 200 mL Mitochondriensuspension wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut. Die Gesamtmenge an Cytochrom c Oxidase betrug zu Beginn der Präparation etwa 400 - 450 mg Enzym. Unter Rühren wurde zunächst ¼ Volumen KCl - Lösung zugegeben und danach Triton X-114 Lösung zugetropft (2 mL auf 100 mL Mitochondriensuspension bei Herzmitochondrien, im Falle von Lebermitochondrien die Hälfte). Nach der Zugabe wurde 10 min gerührt, anschließend 30 Minuten bei 48000 rpm (Ti 60 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand, der maximal 5 % der eingesetzten COX enthielt, wurde vorsichtig abgegossen und verworfen. Das Sediment wurde in Puffer C aufgenommen, so daß ein Gesamtvolumen von 250 mL erreicht wurde. Die Homonigisierung der Suspension erfolgte im Potter und es wurde erneut wie beschrieben zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit demselben Volumen Puffer D aufgenommen, gründlich gepottert und 30 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt vorwiegend den bc<sub>1</sub>-Komplex sowie geringe Mengen COX und wurde verworfen. Das Pellet wurde im gleichen Volumen Puffer D aufgenommen, gepottert und erneut zentrifugiert. Der Überstand enthielt die COX, der Rückstand wurde, sofern er nicht noch bedeutende Mengen des Enzyms enthielt, verworfen.

Der COX-haltige Überstand wurde mit bidest. Wasser auf das vierfache Volumen verdünnt. Anschließend erfolgte die Auftragung der Lösung auf einen frisch mit Puffer E equilibrierten DEAE-Sephacel-Ionentauscher, wodurch hauptsächlich die COX und der bc<sub>1</sub> - Komplex gebunden wurden. Anschließend wurde mit mindestens 3 Säulenvolumen Puffer E gewaschen. Bei der Elution mit Puffer F wurde die COX vom bc<sub>1</sub> - Komplex, der deutlich später eluierte, getrennt und als grüne Fraktion aufgefangen.

Das COX-haltige Eluat wurde unter Rühren mit 1 % (w/v) festem Natriumcholat versetzt. Durch Zugabe kaltgesättigter Ammoniumsulfatlösung erfolgte die Einstellung einer Ammoniumsulfatkonzentration von 28 %. Der pH-Wert der Lösung wurde kontrolliert und auf einen Wert von pH 7,2 - 7,4 eingestellt. Diese Fällung wurde über Nacht durchgeführt, konnte jedoch bei Bedarf auf eine Stunde verkürzt werden. Die Suspension wurde anschließend 15 min bei 15000 rpm (SS34 Rotor) abzentrifugiert und das erhaltene Sediment abgetrennt. Der grüne Überstand wurde nacheinander noch mehreren Fällungen bei einer Konzentration von 37 % , 42 % und 46 % Ammoniumsulfat unterzogen. Diese Fällungen dauerten jeweils eine Stunde und die entstandenen Suspensionen wurden danach abzentrifugiert. Die Sedimente wurden abschließend, getrennt voneinander, in möglichst wenig Puffer B (100 - 500 µL) gelöst, aliquotiert und bei -80° C eingefroren.

Die Reinheit der COX konnte durch Aufnahme eines Spektrums sowie über SDS - PAGE überprüft werden. Saubere, luftoxidierte COX hat einen  $E_{280}/E_{420}$  - Quotienten von 2,6 - 2,8 und weist im SDS-PAGE 13 Banden auf. In der Regel hatten nur die 42% - und 46% - Fraktion eine genügend hohe Reinheit, um sie für spätere Versuche einzusetzen. Die Ausbeute an COX betrug in der 42 % und 46 % Fraktion zusammen zwischen 50 und 120 mg.

## 2.4 Isolierung von Cytochrome c Oxidase nach Yoshikawa

Puffer I:	0,2 M	Natriumphosphat	pH 7.4
Puffer II:	20 mM	Natriumphosphat	pH 7.4
Puffer III:	0,1 M	Natriumphosphat	pH 7.4
Puffer IV:	0,1 M 40 %	Natriumphosphat Natriumcholat	pH 7.4
Puffer V:	0,1 M 2 %	Natriumphosphat Natriumcholat	pH 7.4
Puffer VI:	0,1 M 0,5 %	Natriumphosphat Natriumcholat	pH 7.4
Puffer VII:	0,1 M 0,34 % Brij 35	Natriumphosphat	pH 7.4

Puffer VIII:            0,1 M            Natriumphosphat      pH 7.4  
                             0,21 % Brij 35

Bei dieser Isolierungsmethode (Yoshikawa et al., 1977, Yoshikawa et al., 1988) wurden als erstes nicht Mitochondrien, sondern Mitochondrienfragmente (Keilin - Hartree - Partikel) isoliert, aus denen dann die COX mittels wiederholter fraktionierter Ammoniumsulfatfällung gewonnen wurde. Alle Arbeiten erfolgten in Gegenwart von Cholat als Detergenz bei 4° C.

### **Isolierung der Keilin - Hartree - Partikel**

Ein frisches Rinderherz wurde auf Eis gelagert transportiert und anschließend im Kühlraum bei 4°C verarbeitet. Das Herz wurde von Fett und Sehnen befreit und in kleine Fleischstücke geschnitten. Man erhielt auf diese Weise etwa 800 g Ausgangsmaterial. Das Fleisch wurde durch einen Fleischwolf gedreht. Danach erfolgte eine Aufteilung des Fleisches in sechs Portionen, und nach Zugabe von jeweils 800 mL bidest Wasser und 100 mL Puffer I wurde in einem Waring Blender für 10 min auf höchster Stufe gemixt. Die Gründlichkeit dieses Schrittes war ausschlaggebend für die spätere Ausbeute an COX. Das Homogenat wurde für 10 min bei 4500 rpm im JA 10 Rotor zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt, die vereinigten Rückstände in 1500 mL Puffer II resuspendiert und im Mixer erneut homogenisiert. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm im JA 10 Rotor. Der Überstand wurde mit den Überständen der ersten Zentrifugation vereinigt, während man den Rückstand verwarf. Die vereinigten Überstände wurden mit 30 %iger Essigsäure auf einen pH - Wert von 5,15 - 5,2 eingestellt und für 25 min bei 4500 rpm im JA 10 Rotor zentrifugiert. Der Rückstand wurde zum Waschen in 3 l bidest Wasser resuspendiert und anschließend für 20 min bei 5500 rpm im Ja 10 Rotor zentrifugiert. Nach Aufnahme des Präzipitats in möglichst wenig Puffer III konnte die Proteinkonzentration mittels Biuret - Bestimmung festgestellt werden und anschließend wurde die proteinhaltige Lösung verdünnt, bis die Proteinkonzentration 30 mg Protein / mL Lösung betrug. Normalerweise werden aus 800 g Rinderherz etwa 300 mL dieser Lösung erhalten. Diese Lösung wurde über Nacht bei 4° C stehen gelassen und am nächsten Tag weiterverarbeitet.

### **Isolierung der Cytochrome c Oxidase aus Keilin - Hartree - Partikeln**

Zu der Keilin - Hartree - partikelhaltigen Lösung wurde 50 mL Puffer IV und danach festes Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 33 % gegeben. Bei dieser wie bei allen folgenden Fällungen fand eine ständige Kontrolle des pH - Wertes mit einem pH - Meter statt, so daß der pH - Wert nicht unter 7,3 sank.

Nachdem die Lösung für 30 min gerührt hatte, wurde sie 25 min bei 11000 rpm im SS 34 Rotor abzentrifugiert. Zu dem Überstand wurde festes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 50 % gegeben und anschließend erneut für 25 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer V aufgenommen, so daß sich ein Endvolumen von 200 mL ergab. Zu der Lösung wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 25 % gegeben und es wurde für 30 min gerührt. Dann fand eine erneute Zentrifugation bei 19000 rpm im SS 34 Rotor für 10 min statt. Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat versetzt bis eine Endkonzentration von 50 % erreicht war. Die Suspension wurde zentrifugiert. Wie bei allen späteren Zentrifugationen betrug die Dauer 10 min bei 19000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Puffer VI bis zu einem Endvolumen von 200 mL aufgenommen. Die Lösung wurde mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 25 % versetzt und für 30 min gerührt. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde die Ammoniumsulfatkonzentration im Überstand auf 35 % erhöht und die Suspension zentrifugiert. Das Präzipitat wurde erneut in Puffer VI aufgenommen bis zu einem Endvolumen von 135 mL. Nach der folgenden 25 %igen Ammoniumsulfatfällung wurde für 30 min gerührt und zentrifugiert. Die Ammoniumsulfatkonzentration im Überstand wurde auf 35 % erhöht und es wurde sofort zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer VII so aufgenommen, daß ein Endvolumen von 200 mL entstand. Nach der folgenden 25 %igen Ammoniumsulfatfällung wurde für 30 min gerührt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 35 % versetzt und zentrifugiert. Der Rückstand wurde in Puffer VIII bis zu einem Endvolumen von 200 mL aufgenommen. Diese Lösung wurde über Nacht bei 4°C stehen gelassen und am nächsten Tag weiterverarbeitet.

Mit der Lösung vom Vortag wurde eine 25 %ige Ammoniumsulfatfällung durchgeführt und nach 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 35 % eingestellt und anschließend abzentrifugiert. Das entstandene Präzipitat wurde erneut in Puffer VIII aufgenommen jedoch mit einem Endvolumen von 135 mL und mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 25 % versetzt. Nach 30 min wurde zentrifugiert und im Überstand wurde die Ammoniumsulfatkonzentration diesmal nur auf 33 % erhöht. Das nach der abschließenden Zentrifugation entstandene Pellet ließ sich gut in dem detergenezfreien Puffer III lösen, wobei das Volumen möglichst gering gehalten wurde. Gegen diesen Puffer wurde die Lösung über Nacht, mindestens aber für sechs Stunden, dialysiert.

Am nächsten Tag wurde die Lösung für 20 min bei 19000 rpm im SS 34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand enthielt die COX, deren Reinheitsquotient ( $E_{280} / E_{420}$



im luftoxidierten Spektrum) betrug zwischen 2,5 und 2,6. In der Regel betrug die Ausbeute an COX zwischen 150 und 300 mg.

## **2.5 Proteinbestimmung nach Bradford**

Bradford - Reagenz: 100 mg      Coomassie Brilliant Blue G 250  
                         50 mL      97 % Ethanol  
                         100 mL      85 % Phosphorsäure  
                         mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

Diese quantitative Proteinbestimmung (Bradford, 1976) beruht darauf, daß Coomassie Brilliant Blue komplex an das Protein gebunden wird und dabei die blaue Farbe (Absorptionsmaximum bei 596 nm) des Farbstoffes um ein Vielfaches verstärkt wird.

In einer Mikrotiterplatte wurden 10 - 20 µL Proteinprobe mit 200 µL Bradford - Reagenz versetzt und 10 min inkubiert. Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin mit bekanntem Proteingehalt aufgetragen. Der optimale Meßbereich dieser Methode lag bei 10 - 200 µg Protein / mL Probe. Die Extinktionen von Proben und Eichung wurden in einem Titertek Multiscan Plus Photometer bei 605 nm gemessen. Aus der Kalibrierungskurve konnte die Proteinmengen der Proben direkt abgelesen werden.

## 2.6 Proteinbestimmung nach Biuret

Biuret - Reagenz:    1,5 g   Kupfersulfat  
                          4,5 g   Kaliumnatriumtartrat  
                          4,0 g   Natriumhydroxid  
                          2,5 g   Kaliumiodid

in 500 mL bidest. Wasser lösen  
Lösung ist im Dunkeln aufzubewahren

Trichloressigsäure:  3 M    Trichloressigsäure

Die Proteinbestimmungen bei der COX-Präparation wurden nach einer modifizierten Biuret - Methode (Kadenbach, 1966) durchgeführt.

Die zu bestimmende Proteinprobe wurde in 2 mL bidest. Wasser aufgenommen und anschließend das Protein mit 200 µL 3 M Trichloressigsäure für eine Stunde gefällt. Die gefällten Proteine wurden 10 min bei 1000 g (Heraeus - Christ - Zentrifuge, 3000 rpm) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 mL Biuret - Reagenz gelöst. Nach 15 minütiger Inkubation konnte die Probe mit bidest. Wasser auf das Doppelte verdünnt und die Extinktion der Lösung bei 546 nm in einer 2 mL Küvette gegen Luft bestimmt werden. Durch Zugabe einiger Körnchen Kaliumcyanid zerfiel der Farbkomplex und nach 5 min wurde die unspezifische Trübung ( $E_{\text{KCN}}$ ) bei derselben Wellenlänge bestimmt. Die Absorption des Biuret - Reagenzes ohne Protein ( $E_{\text{Blindwert}}$ ) betrug in der Regel 0,075. Der Proteingehalt berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{mg Protein / Probe} = (E_{\text{Messung}} - E_{\text{KCN}} - E_{\text{Blindwert}}) \times 7$$

Diese Methode ist für Proteinmengen ab 0,2 mg / Probe sensitiv.

## 2.7 Spektroskopische Methoden

### 2.7.1 Differenzspektren

#### Bestimmung von Cytochrom c Oxidase

Meßpuffer: 200 mM      Kaliumdihydrogenphosphat      pH 7,2  
              5 %            Triton X-100 (w/v)

Um die Konzentration der COX während der Präparation zu bestimmen, wurden Spektren mit einem Zweistrahlphotometer (Uvikon 940) aufgenommen. Störende Einflüsse trüber Lösungen oder Einflüsse anderer Substanzen konnten durch die Bildung von Differenzspektren zwischen luftoxidierten und dithionitreduzierten COX-haltigen Proben ausgeschlossen werden. Die Probe wurde im Meßpuffer verdünnt, kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert um Schwebeteilchen weitestgehend zu entfernen. Anschließend wurde die Probe auf zwei Küvetten verteilt und sowohl im Referenz- als auch im Meßstrahlengang positioniert. Nach der Aufnahme der Basislinie (Nullabgleich) wurden zu der Probe im Meßstrahlengang einige Körnchen Natriumdithionit gegeben. Durch das Natriumdithionit fand eine Reduktion des  $bc_1$  - Komplex, von Cytochrom c und der COX statt, wodurch es in diesen Fällen zu einer Veränderung des Spektrums kam. Es folgte die Aufzeichnung des Differenzspektrums im Bereich von 500 - 650 nm. Als Extinktionskoeffizient gilt für die Cytochrome c Oxidase  $\epsilon_{(605 - 630\text{nm})} = 24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (von Jagow und Klingenberg, 1972). Zusätzlich zu der Bestimmung der COX - Konzentration konnte so noch abgeschätzt werden, wie stark die Verunreinigungen der untersuchten Proben waren.

## Bestimmung von Cytochrom c

Meßpuffer: 200 mM Kaliumdihydrogenphosphat      pH 7.2  
5 % Triton X - 100

Die zu untersuchende Probe wurde in beide Strahlengänge des Zweistrahlphotometers (Uvikon 940) in luftoxidierte Form gegeben. Nach dem Nullabgleich wurde die Probe im Meßstrahlengang durch einige Körnchen Natriumdithionit reduziert und anschließend im Bereich von 500 - 650 nm vermessen. Die Konzentration der Probe ließ sich mit dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{(550-590\text{nm})} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Planques et al., 1989) berechnen.

### 2.7.2 Absolutspektren

Meßpuffer: 200 mM Kaliumdihydrogenphosphat      pH 7.2  
2 % Natriumcholat  
0,5 % Natriumdesoxycholat

Durch Aufnahme von Absolutspektren konnte die Konzentration des isolierten und gereinigten Enzyms bestimmt werden. Dazu wurde zunächst die luftoxidierte und danach die dithionitreduzierte Form des Enzyms gegen den Meßpuffer gemessen. Aus dem Spektrum der luftoxidierten Probe konnte der Reinheitsquotient ( $E_{280} / E_{420}$ ) ermittelt werden. Er sollte für saubere COX in einem Bereich von 2,6 - 2,8 liegen. Aus dem Spektrum der dithionitreduzierten Probe wurde die Konzentration des Enzyms bestimmt. Die dazu benötigten Extinktionskoeffizienten waren  $\epsilon_{(605-650 \text{ nm})} = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und  $\epsilon_{(441-490\text{nm})} = 204 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Wikström et al., 1981).

### 2.7.3 Fluoreszenzspektroskopie

Meßpuffer: 10 mM K-Hepes      pH 7.4  
0.005 % Laurylmaltosid

Zur Bestimmung der Fluoreszenz von TNP-ATP wurde ein Fluoreszenz-Spektrometer der Firma Perkin-Elmer (Perkin Elmer 650-40 Fluoreszenz-Spektrometer) verwendet. Die Standardeinstellungen bei der Untersuchung der TNP-ATP-Bindungsstellen an COX waren dabei (analog zu Taanman et al. 1994):

Extinktionswellenlänge : 408 nm  
Spaltbreite: 8 nm  
Fluoreszenzwellenlänge: 450 - 650 nm

Die Fluoreszenz von TNP-ATP wurde als Maximum bei 535 nm bestimmt. Die relative Fluoreszenz ergab sich dabei aus dem Abstand der Peakspitze zur Peakbasis. Die Peakbasis wurde dabei durch Interpolation aus den Wellenbereichen von 450 - 480 nm sowie 560 - 590 nm gewonnen, in denen keinerlei Fluoreszenz unter den verwendeten Bedingungen beobachtbar war. Die TNP-ATP Konzentration betrug während der Titrationsen 0 - 30  $\mu\text{M}$ .

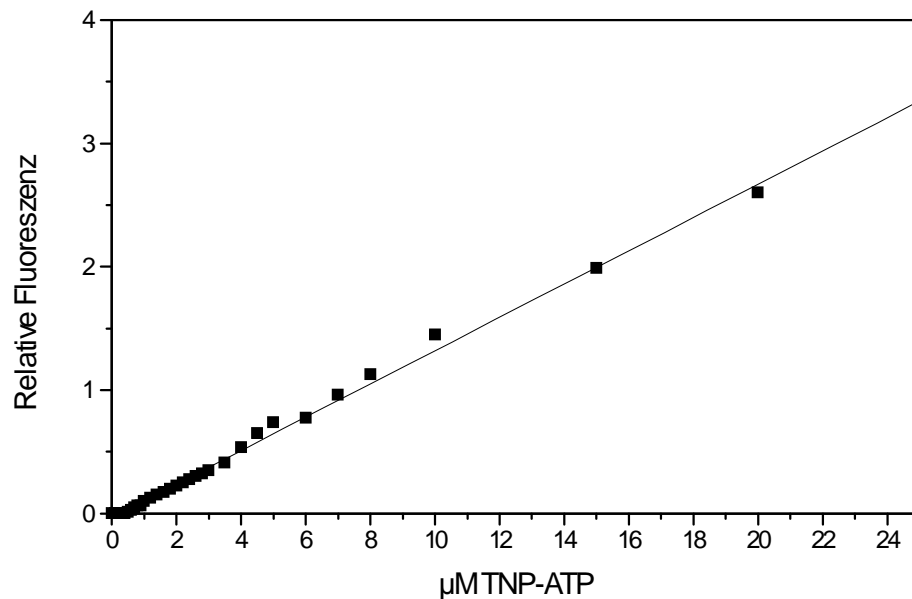
Bei der Bestimmung der Fluoreszenz in Gegenwart von COX enthielt die Meßküvette zusätzlich 0.5  $\mu\text{M}$  COX, die im Meßpuffer solubilisiert wurde.

### **Kalibrierung**

Da TNP-ATP unter den Versuchsbedingungen über eine Eigenfluoreszenz verfügt, wurde als erstes ermittelt, ob die Eigenfluoreszenz proportional zur eingesetzten Menge TNP-ATP ist (Figur 4). Dazu wurde die mit einer Wellenlänge von 408 nm angeregte Fluoreszenz gemessen, die bei einer Wellenlänge von 535 nm emittiert. Die dabei ermittelte relative Fluoreszenz entsprach dem Abstand zwischen Peakspitze und Basis des Grundrauschens in Zentimetern.

Für die hier gewählten Versuchsbedingungen konnte gezeigt werden, daß die Eigenfluoreszenz von TNP-ATP proportional zur eingesetzten Konzentration verlief. Ab einer Konzentration von etwa 60  $\mu\text{M}$  TNP-ATP wurde diese Proportionalität verlassen, da dann die Energiemenge der Lichtquelle nicht mehr ausreichte, um alle TNP-ATP-Moleküle anzuregen. Dies wäre nur durch eine Vergrößerung der Spaltbreite möglich gewesen, hätte aber zu einem breiterem und flacheren Peak geführt und damit zu schlechteren Peak / Grundrausch - Verhältnissen bei kleinen Fluoreszenzwerten.

Die aus diesem Versuch erhaltene Kalibriergerade wurde benutzt, um in späteren Bindungsversuchen die Grundfluoreszenz zu bestimmen und so neuentstandene Fluoreszenz durch Bindung zu ermitteln.



**Figur 4:** Kalibriergerade für die Eigenfluoreszenz von TNP-ATP. In einem Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer 650-40 Fluoreszenz-Spektrometer) wurden steigende Mengen TNP-ATP in 10 mM K-Hepes, pH 7.4 mit 0.005 % Laurylmaltosid vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 408 nm angeregt, die Spaltbreite betrug 8 nm. Das Fluoreszenzspektrum wurde in dem Bereich von 450 nm bis 650 nm aufgenommen. Die Fluoreszenz trat bei 535 nm auf. Die relative Fluoreszenz ergab sich als Abstand zwischen Peakbasis (ermittelt aus den angrenzenden Wellenlängenbereichen) und der Peakspitze in Zentimetern.

## 2.8 Proteolytische Spaltung der COX durch Trypsin

Digestionspuffer:	10 mM	K-Hepes	pH 7.4
	0.05 %	Laurylmaltosid	

5 µM COX wurde in Puffer gelöst und mit Trypsin (Chymotrypsinfrei) im Verhältnis 20:1 (w / w) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) stoppte die Reaktion. Die proteolytischen Spaltung konnte durch Gelelektrophorese überprüft werden.

## 2.9 Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS - PAGE)

Probenpuffer:	62.5 mM	Tris-HCl	pH 6.8
	20 %	Glycerin	(v / v)
	2 %	SDS	
	0,01 %	Bromphenolblau	(w / v)
	5 %	Mercaptoethanol	
Acrylamidlösung:	50 %	Acrylamid	(w / v)
	1.4 %	N, N' - Methylenbisacrylamid	(w / v)
Trenngelpuffer:	0.75 %	Tris - HCl	pH 8.45 - 8.60
	7.2 M	Harnstoff	
	0.2 %	SDS	(w / v)
Sammelgelpuffer:	0.125 M	Tris - HCl	pH 6.8
	0.125 %	SDS	(w / v)
Elektrodenpuffer:	25 mM	Tris - HCl	pH 8.45
	192 mM	Glycerin	
	0.1 %	SDS	(w / v)
APS - Lösung:	10 %	Ammoniumperoxodisulfat	
<i>Trenngel:</i>			
18 % Acrylamid:	2.9 g	Harnstoff	
	11.3 g	Trenngelpuffer	
	7.8 g	Acrylamidlösung	
	50 µL	APS - Lösung	
	10 µL	TEMED	
<i>Sammelgel:</i>			
10 % Acrylamid:	4 mL	Sammelgelpuffer	
	1 mL	Trenngelpuffer	
	25 µL	APS - Lösung	
	5 µL	TEMED	
Färbelösung:	10 %	Ethanol	(v / v)
	30 %	Isopropanol	(v / v)
	0.5 %	Comassie Brilliant Blue R 250	(w / v)
	kalt filtriert		

Entfärber:	5 %	Ethanol	(v / v)
	7.5%	Eisessig	(v / v)

Zur qualitativen Analyse der COX wurde die SDS - PAGE nach Laemmli (1970) in einer modifizierten Form angewendet (Kadenbach et al., 1983). Sie ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von Enzymen in ihre Untereinheiten und die Überprüfung der Reinheit von Proteinen. Die Proben werden dabei in einem Sammelgel zunächst ankonzentriert, um scharfe Banden im Gel zu erzeugen und anschließend im Trenngel proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts der Untereinheiten getrennt. Der hohe Harnstoffanteil bei der in dieser Arbeit verwendeten modifizierten Form der SDS - PAGE verbesserte die Dissoziation der COX in ihre Untereinheiten und erhöhte die Trennschärfe der Elektrophorese.

Zur Elektrophorese wurden vertikale Flachgelapparaturen mit einem Puffervolumen von 2 x 400 mL und einer Gelgröße von 0,75 mm x 120 mm x 220 mm eingesetzt.

### **Probenvorbereitung**

Vor der eigentlichen Gelelektrophorese mußten die Proteinproben mit Probenpuffer für mindestens ein Stunde inkubiert werden. Durch das Mercaptoethanol im Puffer wurden Disulfidbrücken im Protein gespalten. Das Glycerin sorgte dafür, daß die Probe eine höhere Dichte als Wasser erhielt, wodurch die spätere Auftragung erleichtert wurde.

### **Gelelektrophorese nach Kadenbach**

Die Komponenten für Trenn - und Sammelgel wurden unmittelbar vor Gebrauch zusammengegeben. Durch die Zugabe der APS - Lösung und TEMED erfolgte der Start der Polimerisation.

Zwischen zwei, durch Abstandshalter getrennte, senkrecht stehende Glasplatten wurde zunächst das Trenngel gegossen. Das Trenngel sollte etwa 2 cm unterhalb der Oberkante der Glasplatten enden. Das Trenngel wurde sofort mit dem Sammelgel überschichtet und direkt anschließend wurde der Kamm für die Probenaschen zwischen die Glasplatten gesteckt. Nach etwa einer Stunde war die Polimerisation beendet. Sowohl in die obere als auch die untere Pufferkammer wurde Elektrodenpuffer gegeben und die vorbereiteten Proben konnten aufgetragen werden. Als Marker für die Laufront diente das im Probenpuffer enthaltende Bromphenolblau. Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Während dieser etwa einstündigen Startphase fand eine Ankonzentrierung der Proben im Sammelgel statt. Die anschließende elektrophoretische Trennung erfolgte bei 220 - 240 V und dauerte



18 - 20 h. Nachdem der Marker aus der Gelmatrix eluiert war, konnte die Elektrophorese noch maximal eine Stunde fortgeführt werden. Anschließend wurde die Gelelektrophorese gestoppt und das Gel der Apparatur entnommen und gefärbt.

### **Färbung von Polyacrylamidgelen mit Comassie Blue**

Die Gele wurden nach der Elektrophorese bei Raumtemperatur in Färbelösung gelegt und für mindestens eine Stunde, eventuell über Nacht, leicht geschüttelt. Die Färbelösung wurde anschließend abgegossen, das Gel mehrmals mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend solange in Entfärber geschwenkt, bis die Gelmatrix annähernd farblos war und die einzelnen Proteinbanden zu erkennen waren. Je länger die Inkubationszeit in der Färbelösung war, desto intensiver waren später die Proteinbanden gefärbt, aber auch desto länger dauerte das Entfärben des Gels.

## **2.10 Reinigung von monoklonalen IgG**

Phosphatpuffer:	100 mM Natriumphosphat	pH 8.0
Citratpuffer:	100 mM Natriumcitrat	pH 4.5
Tris-Lösung:	2 M Tris	

Um die Funktion einzelner Untereinheiten untersuchen zu können, wurden gereinigte monoklonale Antikörper benötigt. Zur Reinigung wurde die von Prowse und Jenkin (1978) beschriebene Affinitätschromatographie verwendet, bei der die selektive, pH-abhängige Bindung der Antikörper an Staphylokokkenprotein A ausgenutzt wird.

Die Durchführung erfolgte bei 4°C. Die mit Protein A-Sepharose gefüllte Säule wurde mit Phosphatpuffer durch Einsatz einer Pumpe auf pH 8.0 präequilibriert. Nach dem Auftragen von 10 mL in Phosphatpuffer gelöstem Antikörperlyophilisat wurde die Säule mit 50 - 75 mL Phosphatpuffer gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit einem Citratpuffer, wobei die Röhrchen des Fraktionssammler 0.5 mL Tris-Lösung enthielten, da die Antikörper säurelabil sind. Die einzelnen Fraktionen, die etwa 5 mL Antikörperlösung enthielten, wurden im Photometer bei 280 nm vermessen. Die vereinigten Antikörper-haltigen Lösungen wurden im Centricon Concentrator ankonzentriert und konnten anschließend eingesetzt werden. Die Antikörperlösung hielt sich bei 4°C etwa 14 Tage.

## 2.11 ELISA

Boratpuffer:	50 mM	Natriumborat	pH 9.5
	8 M	Harnstoff	
Waschpuffer:	6.5 mM	Dinatriumhydrogenphosphat	pH 7.2
	2.2 mM	Natriumdihydrogenphosphat	
	150 mM	Natriumchlorid	
	0.5 %	Tween - 20	(w / v)
Blockierungsreagenz:	Waschpuffer mit 0.1 % BSA		
Substratpuffer:	100 mM	Natriumacetat	pH 4.2
	50 mM	Natriumdihydrogenphosphat	
Färbelösung:	10 mL	Substratpuffer	
	1.1 mg	ABTS	
	3 µL	30 %ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Lösung	
	jeweils frisch angesetzt		

Der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) diente zur Immunodetektion der COX und beruhte auf einer Methode von Engvall and Perlmann (1971). Um diesen Test auch für Membranproteine zu ermöglichen, mußte der ELISA modifiziert werden (Schneyder, 1990), indem der übliche Coating - Puffer durch einen harnstoffhaltigen Puffer ersetzt wurde.

In der eingesetzten Variante wurde die COX aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an das Polystyrol der Mikrotiterplatten gebunden. Antikörper, die gegen das Holoenzym oder gegen eine der Untereinheiten gerichtet sind, können an das gebundene Enzym fixiert werden und mittels einer Farbreaktion detektiert werden.

### Coating des Antigens

4 µg COX wurden in 1 mL Boratpuffer gelöst und jeweils 100 µL wurden in die Wells der Mikrotiterplatten pipettiert. Nach der Inkubation, die bei 4°C über Nacht erfolgte, wurden die Platten entleert und dreimal mit 200 µL Waschpuffer / Well gewaschen und anschließend für 2 h mit 100 µL Blockierungsreagenz bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurde in jedes Well

200 µL Waschpuffer gegeben. Die ELISA - Platten konnten sofort verwendet oder aber in Alufolie eingepackt bei 4° C aufbewahrt werden.

### **ELISA - Test**

Beim eigentlichen Immuntest wurden die Platten von Waschpuffer befreit, mit zu untersuchenden Antikörperlösungen versetzt und eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem Ausschlagen sowie dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der die spätere Erkennung durch eine Farbreaktion ermöglichte. Bei monoklonalen Antikörpern handelte es sich um Peroxidase - konjugierte anti - Maus Immunoglobuline, die im Waschpuffer 1 / 1000 verdünnt wurden. Pro Well wurde 100 µL Antikörperlösung eingesetzt. Nach einer Stunde Schütteln wurde erneut dreimal gewaschen und durch Zugabe von 100 µL der frisch angesetzten Färbelösung pro Well startete die Färbereaktion. Die Intensität der entstehenden Grünfärbung ist nach Abzug des Blindwertes proportional zur Menge des primären Antikörpers, der an das Antigen gebunden hat. Die Messung des Farbstoffes erfolgte nach 30 min im ELISA - Photometer (Titertek Multiscan Plus) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

### **Halbquantitative ELISA - Titration**

Probenpuffer:	50 mM Kaliumphosphat	pH 7.4
	1 % Tween 20	

Um die Konzentration eines gereinigten Antikörpers oder eines antikörperhaltigen Serums abzuschätzen, wurde eine halbquantitative Titration durchgeführt. Mit Probenpuffer wurde COX so weit verdünnt, daß eine 1 µM Lösung entstand. Zu 100 µL Aliquots dieser Lösung wurden verschiedene Mengen der antikörperhaltigen Probe gegeben (0.1 - 30 µL). Nach einer Inkubationszeit von 12 h wurden mit den Proben ein ELISA - Test durchgeführt. Auf diese Weise konnte bestimmt werden, welche Menge Antikörperlösung benötigt wurde, so daß eine bekannte Menge COX abgesättigt und noch genügend freier Antikörper in der Probe vorhanden war, um noch an die gecoatete COX zu binden. Diese Daten waren Grundlage für die später eingesetzten Mengen an Antikörperlösungen in anderen Versuchen.

## 2.12 Reinigung von Asolectin

Verunreinigungen des käuflichen Asolectins wurden nach einer Vorschrift von Kagawa und Racker (1971) entfernt.

10 g Asolectin rührten in 200 mL Aceton für 48 h bei 4 °C. Nach anschließender Filtration wurde der Rückstand mit wenig Aceton gewaschen und in 40 mL Diethylether aufgenommen. Nach erneuter Filtration kristallisierte das Asolectin durch Verdampfen des Ethers aus und wurde bei -20° C aufbewahrt.

## 2.13 Reinigung des Amberlites XAD-2

Waschlösung:	100 mM	NaCl
	100 mM	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

Zur Reingung des Adsorberharzes XAD-2 wurden nach einer Vorschrift von Müller et al. (1986) 5 g für 15 min in 200 mL Waschlösung langsam gerührt, anschließend über eine Glasfritte abgesaugt und mit 500 mL bidest. Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde für 15 min in 100 mL Methanol gerührt, das Methanol durch Absaugen über eine Glasfritte entfernt und der Rückstand mit 1.5 L bidest. Wasser gewaschen. Das gereinigte XAD-2 wurde in bidest. Wasser bei 4° C aufbewahrt.

## 2.14 Herstellung von Proteoliposomen

Rekonstitutionspuffer:	10 mM Kalium-Hepes	pH 7.4
	40 mM KCl	
	1.5 % Natriumcholat	
Dialysepuffer:	10 mM Kalium-Hepes	pH 7.4
	40 mM KCl	

Die Bildung von Proteoliposomen beruht auf Lösung von Asolectin und COX im Rekonstitutionspuffer und dem anschließendem Entfernen des Natriumcholats (Casey et al., 1979 und 1979b). Dazu wurde das gereinigte Asolectin (40 mg / mL) im Rekonstitutionspuffer durch Ultraschall (Branson Sonifer, 30 % Leistung, 3 x 2 min mit je 2 min Pause) im Eisbad gelöst. Nach Hinzufügen von 3 µM COX

und falls erforderlich von Nukleotid oder Antikörper wurde das Natriumcholat durch Adsorption an Amberlite XAD-2 entfernt. Dazu wurde die COX-haltige Lösung in Gegenwart von 50 mg / mL XAD-2 in einer Mikrotiterplatte für 22 h bei 4°C inkubiert und die klare Vesikel enthaltende Lösung vorsichtig vom Adsorbens abgehoben. Anschließend dialysierten die Vesikel für 24 h gegen Dialysepuffer, der nach den ersten 4 - 6 h einmal gewechselt wurde.

## **2.15 Polarographischer Enzymtest**

### *Solubilisiertes Enzym:*

Phosphatpuffer:	50 mM	Kaliumphosphat	pH 7.4
	1 mM	EDTA	
	1 % Tween 20 oder 1 % Tween 80 oder 0.5 % Laurylmaltosid		
Hepes-Puffer:	10 mM	Kalium-Hepes	pH 7.4
	1 % Tween 20 oder 1 % Tween 80 oder 0.5 % Laurylmaltosid		

### *Rekonstituiertes Enzym:*

Hepes-Puffer	10 mM	Kalium-Hepes	pH 7.4
	40 mM KCl		
Ascorbat-Lösung:	1 M	Tris-Ascorbat	pH 7.4
Cytochrom c:	4 mM	Cytochrom c	

Die Aktivität der COX wurde durch die Messung des Sauerstoffverbrauchs in einer thermostatisierten Rührzelle bei 25°C bestimmt. Dabei wurde die Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Meßpuffer potentiometrisch mittels einer Clark - Sauerstoffelektrode gemessen (Ferguson - Miller et al., 1976 und 1978).

Die COX - Konzentration bei der Vermessung solubilisierter COX betrug während der Messung 50 nM, der Meßpuffer enthielt K - Hepes oder Kaliumphosphat als Puffersubstanz sowie ein nichtionisches Detergenz, das mindestens im zehnfachen Überschuß vorhanden war.

Bei der Bestimmung der Atmungsraten rekonstituierter COX betrug die COX-Konzentration in der Meßzelle 20 nM.

Die Messungen wurden in Gegenwart von 20 mM Tris - Ascorbat (pH 7,4) durchgeführt. Cytochrom c wurde in einer Meßreihe im Bereich von 0,026 µM bis zu 78 µM verwendet.

Zur Bestimmung der Atmungskontrolle wurde das Verhältnis der Aktivität rekonstituierter COX vor und nach Zugabe von Entkopplern ermittelt. Dabei erfolgte die Messung der Valinomycin-entkoppelten Atmung in Gegenwart von  $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ , die der völlig entkoppelten Atmung in Anwesenheit von  $2 \mu\text{g} / \text{mL}$  Valinomycin und  $3 \mu\text{M}$  CCCP.

## 2.16 Darstellung von $[^{35}\text{S}]\text{ADP}\alpha\text{S}$ aus $[^{35}\text{S}]\text{ATP}\alpha\text{S}$

ATP-Lösung :	5 mM	ATP	pH 7.4
	50 mM	Natriumphosphat	
	100 mM	KCl	

Glucose-Lösung:	1 M	D-Glucose	
	1 mM	Magnesiumchlorid	
	50 mM	Natriumphosphat	pH 7.4
	100 mM	KCl	

Inkubationspuffer:	50 mM	Natriumphosphat	pH 7.4
	100 mM	KCl	

Hexokinase-Lösung:	0.2 %	Hexokinase
--------------------	-------	------------

$[^{35}\text{S}]\text{-ATP}\alpha\text{S}$ -Lösung: 400 Ci / mmol, 10 mCi / mL  $[^{35}\text{S}]\text{-ATP}\alpha\text{S}$

Die Gewinnung von  $[^{35}\text{S}]\text{-ADP}\alpha\text{S}$  aus  $[^{35}\text{S}]\text{-ATP}\alpha\text{S}$  erfolgte durch Umsetzung des Ausgangsstoffes mit Hexokinase (HK). Dieses aus dem Glykolysestoffwechsel stammende Enzym katalysiert folgende Reaktion:



Um die Reaktion durchzuführen, wurde das Reaktionsgemisch angesetzt, indem

20 µL	ATP-Lösung
5 µL	[ <sup>35</sup> S]-ATP $\alpha$ S-Lösung
20 µL	Glucose-Lösung
37.5 µL	1mM MgCl <sub>2</sub>
100 µL	Hexokinase-Lösung
817.5 µL	Inkubationspuffer

zugegeben wurden,

Das Reaktionsgemisch wurde im Wasserbad für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Hexokinase wurde aus der Lösung entfernt, indem in Centrikonröhrchen (20 kD Ausschlußvolumen) bei 4 °C und 3000 rpm für 30 min zentrifugiert wurde. Das Zentrifugat enthielt das [<sup>35</sup>S]-ADP $\alpha$ S.

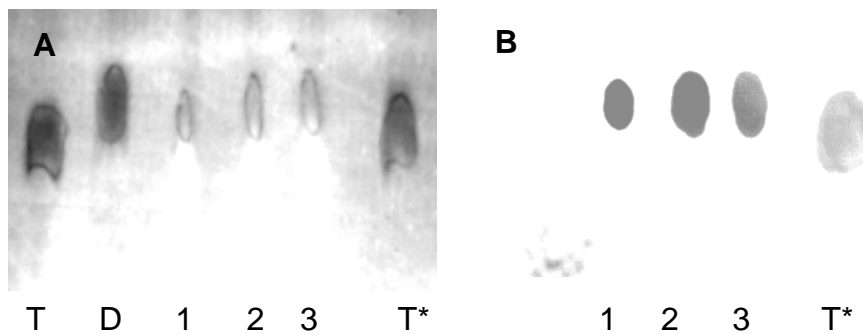
Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels Papierchromatografie und Autoradiografie überprüft.

Durch geeignetes Verdünnen der [<sup>35</sup>S]-ADP $\alpha$ S-Lösung mit nichtmarkiertem ADP konnte die gewünschte Stärke an Radioaktivität eingestellt werden.

### **2.16.1 Papierchromatografie und Autoradiografie zur Kontrolle der Synthese von [<sup>35</sup>S]-ADP $\alpha$ S**

Laufmittel:	100 Teile	Isobuttersäure
	60 Teile	1 M Ammoniak
	1.6 Teile	0.1 M EDTA

Die Umsetzung von [<sup>35</sup>S]-ATP $\alpha$ S zu [<sup>35</sup>S]-ADP $\alpha$ S ließ sich über Papierchromatografie und Autoradiografie überprüfen. Dazu wurde auf ein Whatman-Papier etwa 3 cm vom Rand entfernt die zu untersuchenden Proben aufgetragen und im Laufmittel entwickelt. Da sich das Laufverhalten von ATP und ADP nur geringfügig unterscheidet, war es wichtig jeweils Proben dieser beiden Nukleotide als Kontrolle mit aufzutragen. Nach beendetem Lauf konnten die Nukleotide im UV-Licht (254 nm) beobachtet werden (Figur 5). Die R<sub>f</sub>-Werte betrugen dabei für ATP R<sub>f</sub> = 0.46 und für ADP R<sub>f</sub> = 0.53. Das Auszählen eines Bereichs der Spur 2 auf Höhe der T\*-Markierung und des Bereichs innerhalb der Markierung auf Spur 2 im Szintillationszähler, ergab einen ATP-Gehalt von kleiner 0.5 % innerhalb der aufgetragenen Probe.



**Figur 5:** Chromatogramm (A) und Autoradiogramm (B) der Trennung von ADP und ATP. Um die Nukleotide sichtbar zu machen, wurden das Chromatogramm mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Spur T: ATP, Spur D: ADP, Spur 1,2,3: Proben der Umsetzung zu [ $^{35}\text{S}$ ]-ADP $\alpha$ S nach 30, 60, 120 min Inkubationszeit, Spur T\*: [ $^{35}\text{S}$ ]-ATP $\alpha$ S.

## 2.17 Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Nukleotiden

### 2.17.1 Filtermethode

Probenpuffer:	10 mM	Kalium-Hepes	pH 7.4
	1 %	Tween 20	
[ $^{35}\text{S}$ ]ATP $\alpha$ S-Lösung:	500 $\mu\text{M}$	[ $^{35}\text{S}$ ]ATP $\alpha$ S	
	5 $\mu\text{L}$ / mL	[ $^3\text{H}$ ]Succrose oder 2 $\mu\text{L}$ / mL [ $^3\text{H}$ ]H $_2\text{O}$	
	in Probenpuffer		
[ $^{35}\text{S}$ ]ADP $\alpha$ S-Lösung:	500 $\mu\text{M}$	[ $^{35}\text{S}$ ]ADP $\alpha$ S	
	5 $\mu\text{L}$ / mL	[ $^3\text{H}$ ]Succrose oder 2 $\mu\text{L}$ / mL [ $^3\text{H}$ ]H $_2\text{O}$	
	in Probenpuffer		

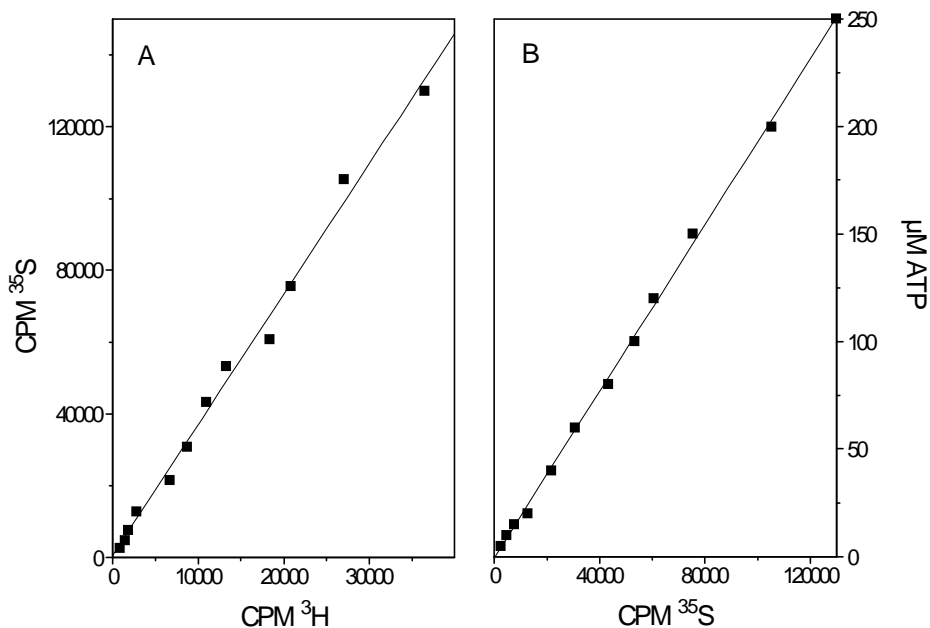
Mit der Filtermethode war es möglich die Bindung von ATP oder ADP an COX direkt zu bestimmen. 5  $\mu\text{M}$  COX in Probenpuffer gelöste COX inkubierte mit zugesetzter Nukleotidlösung (2.5 - 250  $\mu\text{M}$ ) bei einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{L}$  für 30 h bei 4°C. Anschließend wurde die Probe auf eine Ultrafiltrationsmembran (aus Polysulfon 100.000 Da, 25 mm  $\varnothing$ ) gegeben und die Lösung im Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Dabei verblieb die COX auf dem Filter. Die Filter wurden in Szintillationsflüssigkeit gegeben und die durch  $^3\text{H}$  und  $^{35}\text{S}$  verursachte Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt. Die  $^3\text{H}$ -



Radioaktivität wurde zur Bestimmung der unspezifisch im Filter gebundenen Nukleotide benutzt, indem vor den Bindungsstudien eine Kalibriergerade zur Ermittlung des Verhältnisses der  $^3\text{H}$ - zur  $^{35}\text{S}$ -Radioaktivität erstellt wurde.

### 2.17.2 Kalibrierung

Um unspezifische Radioaktivität, die durch im Filter befindliche Nukleotide entstand, bestimmen zu können, enthielt die Nukleotidlösung mit Tritium markierte  $^3\text{H}$ -Succrose, die als Kalibrierradioaktivität diente. Dazu mußte in einem Vorversuch eine Kalibrierung zwischen  $^{35}\text{S}$ -Radioaktivität und  $^3\text{H}$ -Radioaktivität durchgeführt werden.



**Figur 6:** Kalibriergeraden zur Bestimmung des unspezifisch gebundenen  $^{35}\text{S}$ -ATP $\alpha$ S sowie der spezifisch gebundenen Menge ATP. Die [ $^{35}\text{S}$ ]ATP $\alpha$ S-haltige Lösung (1000-fach mit unmarkiertem ATP verdünnt) enthielt zusätzlich 5  $\mu\text{L/mL}$  [ $^3\text{H}$ ]-Succrose zur Bestimmung des unspezifisch gebundenen ATP (Figur 6A). Die sich daraus ergebende Restradioaktivität des  $^{35}\text{S}$ -ATP $\alpha$ S wurde zur Bestimmung des spezifisch gebundenen ATP benutzt (Figur 6B).

Die sich aus Figur 6 ergebene Beziehung zwischen der schwefelbedingten und der tritiumbedingten Radioaktivität wurde bei den eigentlichen Bindungsmessungen benutzt, um die im Filter unspezifisch gebundene Menge Nukleotid zu bestimmen. Diese Größe wurde dann vom Messwert, der die Summe

aus spezifisch und unspezifisch gebundenen Nukleotiden darstellte, abgezogen, damit die spezifisch an COX gebundene Menge ATP bestimmt werden konnte.

### **2.17.3 Gleichgewichtsdialyse**

Probenpuffer:	50 mM	Kaliumphosphat	pH 7.4
	100 mM	KCl	
	1 %	Tween 20	

Die Verwendung der Gleichgewichtsdialyse ermöglichte die Untersuchung der Bindung von Nukleotiden an COX unter reversiblen Bedingungen durchzuführen. In einer entsprechenden Vorrichtung (Dunkel, 1993) war eine kugelförmige Kammer durch eine Dialysemembran in zwei gleiche Hälften unterteilt. Beide Kammern wurden mit 100 µL Pufferlösung befüllt, der [<sup>35</sup>S]ATPαS oder [<sup>35</sup>S]ADPαS in einer Konzentration von 2.5 - 250 µM zugesetzt war. Eine der beiden Hälften enthielt zusätzlich 5 µM COX. Die Bindung des Nukleotids an das Enzym bewirkte eine Anreicherung der Radioaktivität auf der Seite der Kammer, die das Enzym enthielt.

Die Dialyse wurde 72 Stunden bei 4°C unter Schütteln durchgeführt. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde beiden Seiten zweimal 40 µL entnommen, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem Szintillationszähler vermessen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bindungsstudien mit TNP-ATP

Um Aussagen über die Bindungsstellen der COX für ATP machen zu können, wurde in dieser Arbeit das ATP-Derivat 2'(3') - O -(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosin-triphosphat (TNP-ATP) verwandt. Dieses Derivat besitzt gegenüber dem nativen ATP zwei Vorteile. So bindet es bei vielen Enzymen mit einer höheren Affinität und die Bindung kann mittels Fluoreszenzphotometrie untersucht werden (Nakamoto and Inesi, 1984, Hiratsuka, 1985), da die Fluoreszenz mit der Bindung von TNP-ATP ansteigt. In einer Arbeit von Taanman et al. (1994) konnte bereits an Cytochrom c Oxidase aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) gezeigt werden, daß TNP-ATP bindet.

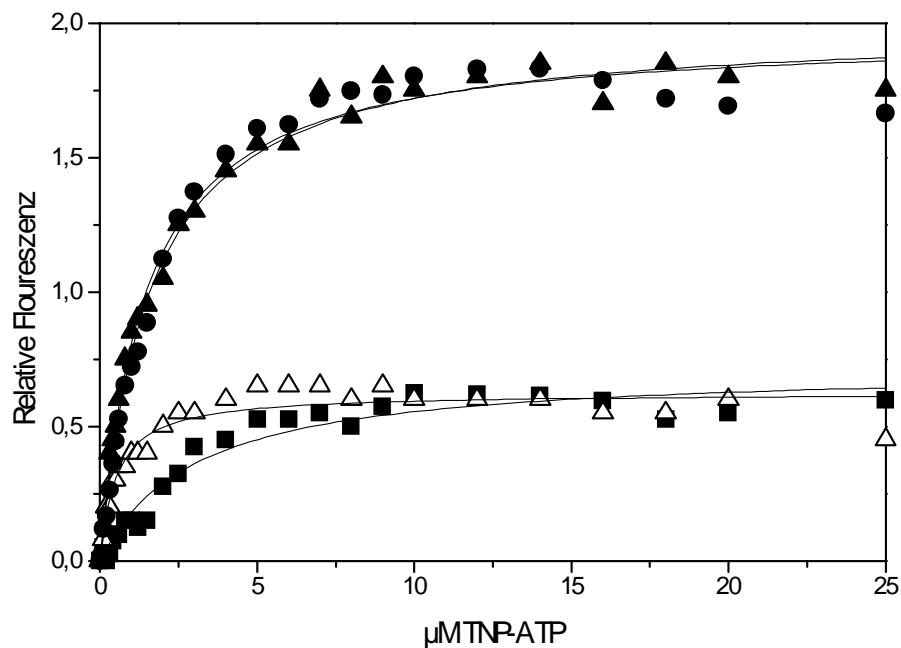
#### 3.1.1 Messung von Cytochrom c Oxidase

Zur Untersuchung der Bindungsstellen für TNP-ATP wurde zuerst das Rinderherzenzym vermessen. Dazu wurden 0.5 µM COX im Meßpuffer solubilisiert und vermessen. Anschließend wurde von der gemessenen Fluoreszenz die Eigenfluoreszenz des TNP-ATP (siehe 2.7.3.) subtrahiert, so daß die durch Bindung zusätzlich entstandene Fluoreszenz bestimmt wurde. Analog wurde mit dem Rinderleberenzym verfahren. Auf diese Weise sollte bestimmt werden, ob es aufgrund der im Rind vorkommenden Isoformen für die COX-Untereinheiten VIa, VIIa und VIII Unterschiede in den Bindungseigenschaften für TNP-ATP gibt (Figur 7). Es konnten keine Unterschiede zwischen Rinderherz- und Rinderleber-COX in der Fluoreszenzzunahme beobachtet werden.

Um die Lage einzelner Bindungsstellen näher bestimmen zu können, wurde das Rinderherzenzym einem Trypsinverdau unterzogen. Bei einem Trypsinverdau spalten bevorzugt die Untereinheiten VIa und VIb sowie langsamer die Untereinheiten IV, VIIa und VIIb ab. (Capitanio et al., 1994). Anschließend wurde an dem so behandelten Enzym die Bindung von TNP-ATP fluoreszenzphotometrisch untersucht. Dabei wurde eine auf ein Drittel reduzierte Fluoreszenzzunahme gemessen (Figur 7).

Um einen Vergleich zwischen COX aus Säugetier und Prokaryoten zu haben, wurde die Bindung von TNP-ATP an COX aus *Paracoccus denitrificans*

untersucht. Das native 4 Untereinheiten Enzym enthielt isolierungsbedingt nur noch die Untereinheit I und II. Dieses Enzym wurde analog dem Rinderherzenzym vermessen. Die dabei gefundene Bindungsfluoreszenz entsprach vom Endwert dem des trypsinverdauten Enzyms, wobei dieser Endwert erst bei höheren TNP-ATP-Konzentrationen erreicht wurde (Figur 7).



**Figur 7:** Bindungsinduzierte Fluoreszenzzunahme von TNP-ATP durch Titration von COX aus Rinderherz, Rinderleber, *Paracoccus denitrificans* (2 UE) sowie trypsinverdauter COX aus Rinderherz mit TNP-ATP. In einem Perkin-Elmer 650 - 40 Fluoreszenz - Spektrometer wurden 0.5  $\mu\text{M}$  COX in 10 mM K-Hepes, pH 7.4 in Gegenwart von 0.005 % Laurylmaltosid vermessen (Genauere Versuchsbedingungen siehe 2.7.3.). Geschlossene Dreiecke: Rinderherz-COX, geschlossene Kreise: Rinderleber-COX, offene Dreiecke: trypsinverdautes Rinderherzenzym, geschlossene Quadrate: *Paracoccus*-COX (2 UE).

### 3.1.2 Auswertung

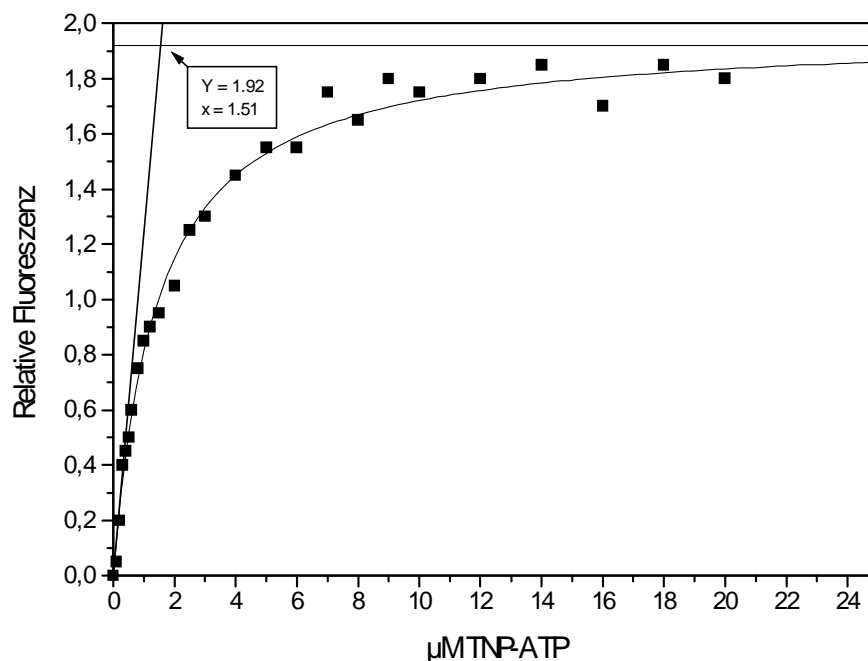
Bei der Auswertung der Fluoreszenzmessungen ergab sich das Problem, daß mit dem Fluoreszenzspektrometer von Perkin - Elmer die Messung von Absolutwerten ohne Kalibrierung nicht möglich war. Für eine Kalibrierung wurde jedoch eine Bezugsmessung benötigt, bei der bekannt war, wieviel TNP-ATP gebunden wurde. Da dies in den hier gemachten Untersuchungen nicht möglich war, konnte nur eine indirekte Bestimmung der Anzahl der Bindungsstellen durchgeführt werden.

Aus der maximalen Höhe der Fluoreszenz der unbehandelten Rinderherz-COX sowie der trypsinverdauten Rinderherz-COX ergab sich ein Verhältnis von 3.1 : 1. Dies ließ den Schluß zu, daß insgesamt entweder 3 oder 6 Bindungsstellen für TNP-ATP am Rinderherzenzym vorhanden sind.

Dasselbe Verhältnis für das unbehandelte Rinderherz- sowie das *Paracoccus*-Enzym betrug 2.98 : 1. Für das *Paracoccus*-Enzym wurde bereits 1 ATP-Bindungsstelle bestimmt (Rieger et. al., 1995). Unter der Annahme, daß TNP-ATP maximal die Bindungsstellen besetzen kann, die auch ATP belegt, ergab sich für das unbehandelte Rinderherzenzym aufgrund der Verhältnisse der Fluoreszenzen, daß es 3 Bindungsstellen für TNP-ATP enthält.

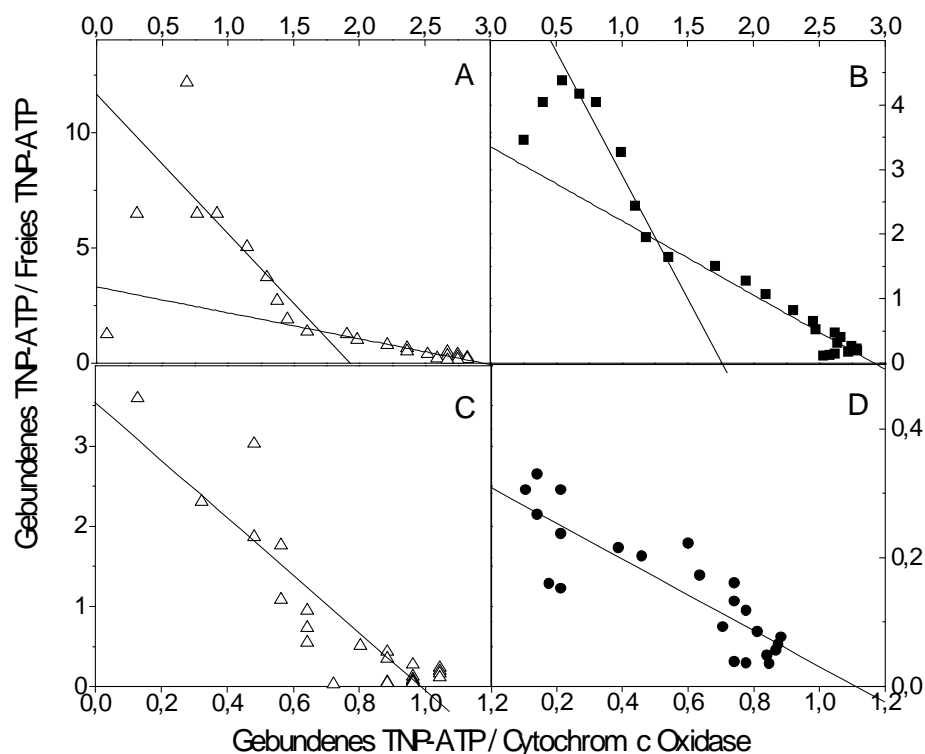
Eine weitere indirekte Methode war grafischer Natur. Dazu wurde die Anfangssteigung der Fluoreszenzzunahme sowie der Endwert, der die maximale Fluoreszenzzunahme angibt, grafisch oder mathematisch extrapoliert. Es wurde anschließend berechnet, bei welcher TNP-ATP-Konzentration die Gerade mit der Anfangssteigung den Endwert erreicht hat. Hinter diesem Verfahren steckte die Überlegung, daß sich bei sehr geringen Konzentrationen das gesamte TNP-ATP an die Bindungsstellen anlagert und die entstandene Fluoreszenz nur durch die zugegebene Menge Substrat beschränkt wurde (Figur 8).

Der Schnittpunkt der beiden Geraden gab die TNP-ATP-Konzentration an, die der benötigten Menge an TNP-ATP entsprach um alle Bindungsstellen abzusättigen. Nach dieser Methode ergab sich, daß maximal 1.51  $\mu\text{M}$  TNP-ATP an 0.5  $\mu\text{M}$  Rinderherz-COX gebunden werden. Dies entspricht einem TNP-ATP / COX Verhältnis von 3.02 : 1.



**Figur 8:** Bestimmung der Bindungsstellen für TNP-ATP am Beispiel der Daten für Rinderherz-COX. Die Fluoreszenzdaten sind der Figur 7 entnommen. Die Anfangssteigung wurde aus den Daten bis 0.5  $\mu\text{M}$  TNP-ATP extrapoliert, der Endwert (horizontale Gerade) aus der hyperbolischen Fitfunktion entnommen. Als Schnittpunkt ergab sich eine TNP-ATP-Konzentration von 1.51  $\mu\text{M}$ .

Da die drei verschiedenen indirekten Methoden der Auswertung zu gleichen bzw. sich nicht widersprechenden Ergebnissen führten, konnten nun alle Messungen durch diese indirekte Methode geeicht werden. Anschließend war es möglich von den einzelnen Messungen Scatchard-Plots anzufertigen, um so neben der Bindungszahl auch die Affinität der einzelnen Bindungsstellen für TNP-ATP zu bestimmen (Figur 9).



**Figur 9 :** Scatchardplots der vier Messungen aus Figur 7. Aufgetragen wurden die Daten für COX aus Rinderherz (A), Rinderleber (B), Rinderherz nach vorherigem Trypsinverdau (C) und *Paracoccus denitrificans* (D).

Im Falle der Rinderherz-COX sowie der Rinderleber-COX ist im Scatchard-Plot eine Zweiphasigkeit festzustellen, das heißt, daß es Bindungsstellen mit verschiedenen Affinitäten für TNP-ATP gibt (Tabelle 2).

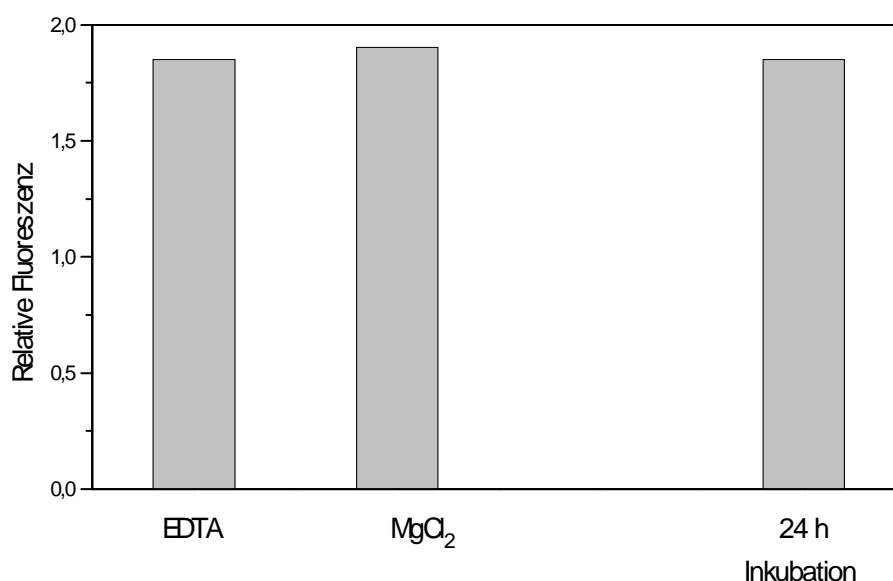
**Tabelle 2:** Dissoziationskonstanten und Anzahl der Bindungsstellen für TNP-ATP an COX aus Rinderherz, Rinderleber, *Paracoccus denitrificans* sowie trypsinverdaulichem Rinderherzenzym. Die Daten wurden aus den Scatchard-Plots aus Figur 9 entnommen.

Enzym aus	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	Anzahl der Bindungsstellen
Rinderherz	$0.20 \pm 0.03$ (2x) $0.94 \pm 0.05$ (1x)	$2.96 \pm 0.33$
Rinderleber	$0.26 \pm 0.03$ (2x), $0.93 \pm 0.05$ (1x)	$2.93 \pm 0.26$
Rinderherz, trypsinverdaut	$0.28 \pm 0.04$	$0.99 \pm 0.04$
<i>Paracoccus denitrificans</i>	$3.6 \pm 0.5$	$1.11 \pm 0.20$

Aus den Daten ergaben sich sowohl für die Anzahl der Bindungsstellen für TNP-ATP als auch für deren Affinitäten keinerlei Unterschiede zwischen dem Herz- und dem Leberenzym. Aufgrund des Trypsinverdaus kann angenommen werden, daß zwei der TNP-ATP-Bindungsstellen an den Untereinheiten IV, VIa, VIb, VIIa, VIIb oder VIII liegen. Eine der Bindungsstellen sollte an der Untereinheit I, II, III, Va, Vb oder VIc liegen. Da das *Paracoccus*-Enzym mit nur zwei Untereinheiten ebenfalls eine Bindungsstelle besitzt, sollte diese aufgrund der Homologien auch beim Rinderenzym an der Untereinheit I oder II liegen.

### 3.1.3 Beeinflussung der Bindungsstellen durch äußere Effektoren

Um zu bestimmen, ob die Bindung des TNP-ATP abhängig von der Gegenwart von  $Mg^{2+}$  - Ionen ist, wurde die Bindung von TNP-ATP an das Rinderherzenzym in Anwesenheit von EDTA bzw.  $MgCl_2$  durchgeführt. Sowohl die Anzahl der Bindungsstellen als auch deren Affinität wurde dadurch nicht verändert.



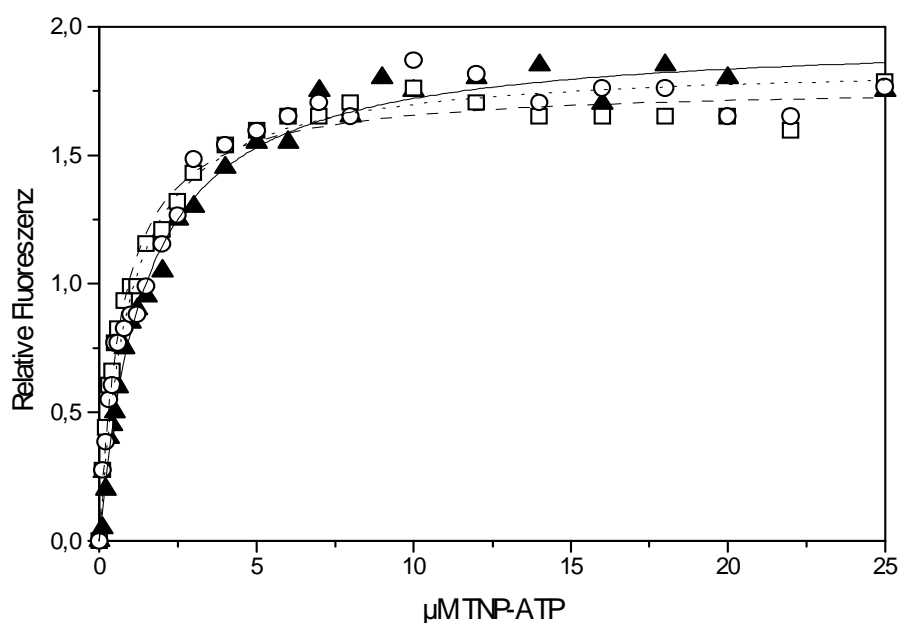
**Figur 10:** Einfluß von EDTA, Magnesiumchlorid oder Inkubationszeit auf die Anzahl der Bindungsstellen. In der Meßküvette befand sich 0.5  $\mu M$  Rinderherz-COX in 10 mM K-Hepes, pH 7.4 in Gegenwart von 0.005 % Laurylmaltosid. Zur Messung wurde eine TNP-ATP-Konzentration von 25  $\mu M$  in der Meßzelle eingestellt. Bei der Untersuchung des Einflusses von EDTA bzw. Magnesiumchlorid auf die Bindung von TNP-ATP befand sich im Puffer jeweils 1 mM des angegebenen Reagenzes. Bei der Messung der Zeitabhängigkeit wurde das Enzym in dem beschriebenen, EDTA- und  $MgCl_2$ -freien Puffer in Gegenwart von 25  $\mu M$  TNP-ATP für 24 h bei 0 °C vorinkubiert.



Um kryptische Bindungsstellen, die erst nach einiger Zeit vom Substrat erkannt werden können, zu bestimmen, wurde untersucht, ob sich die Anzahl der Bindungsstellen ändert, wenn man das Rinderherzenzym vor der Messung für 24 h mit TNP-ATP vorinkubiert. Dabei wurde keinerlei Erhöhung der Fluoreszenz und somit der Bindung von TNP-ATP festgestellt (Figur 10).

### 3.1.4 Einfluß eines Antikörpers gegen Untereinheiten VIa-H, VIc auf die Bindung von TNP-ATP

In der Arbeit von Frank und Kadenbach (1996) konnte gezeigt werden, daß die  $H^+/e^-$  Stöchiometrie des Rinderherzenzyms durch ATP von 1 auf 0.5 gesenkt werden kann. Die dafür verantwortliche ATP - Bindungsstelle liegt auf der Matrixseite der herzspezifischen Untereinheit VIa, da dieser Effekt durch einen für diese Untereinheit spezifischen, monoklonalen Antikörper gehemmt werden kann.



**Figur 11:** Messung der Bindung von TNP-ATP in Gegenwart monoklonaler Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc bzw. VIIa der COX. Rinderherz-COX wurde über Nacht bei 0°C mit einem Überschuß Antikörper vorinkubiert. Die Messungen wurden wie unter Figur 7 beschrieben durchgeführt. Geschlossene Dreiecke: Rinderherz-COX ohne Antikörper (durchgezogene Linie), offene Vierecke: mit AK VIa-H vorinkubiert (unterbrochene Linie), offene Kreise: mit AK VIIa-Mensch vorinkubiert (gepunktete Linie).

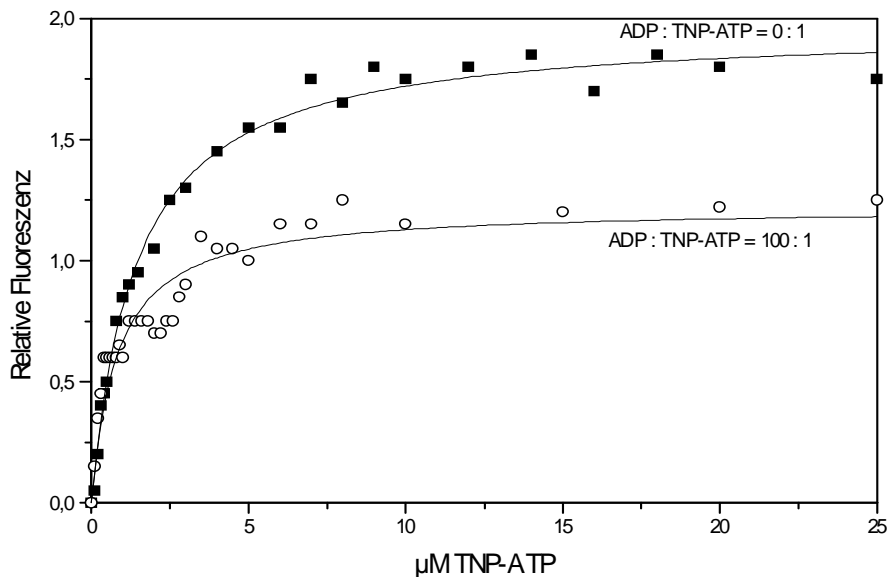
Es wurde daher untersucht, ob sich die Anzahl der Bindungsstellen bzw. deren Affinität in Gegenwart des Antikörpers gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc für das

Rinderherzenzym änderte. Zur Kontrolle wurden dieselben Messungen auch in Gegenwart eines Antikörpers gegen die Untereinheit VIIa des menschlichen Enzyms durchgeführt, da dieser nicht an das Rinderenzym bindet.

In Anwesenheit beider Antikörper war dieselbe maximale Fluoreszenzsteigerung beobachtbar, wie beim unbehandelten Enzym, wobei in Gegenwart der Antikörper die Affinität der beiden hochaffineren Bindungsstellen von  $0.2\ \mu\text{M}$  auf  $0.1\ \mu\text{M}$  stieg (Figur 11). Dies bedeutet, daß die Bindung von TNP-ATP an der COX durch den Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc nicht beeinflußt wurde.

### 3.1.5 Konkurrenz der TNP-ATP-Bindung durch ADP

Um zu untersuchen, ob die TNP-ATP-Bindung sich durch ADP kompetitieren ließ, wurde der TNP-ATP-Stammlösung ein 100-facher Überschuß an ADP zugesetzt. Auf diese Weise wurde bei der Titration mit TNP-ATP immer ein Verhältnis von ADP zu TNP-ATP von 100 : 1 eingehalten. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, daß die Eigenfluoreszenz des TNP-ATP durch ADP nicht beeinflußt wurde.



**Figur 12** : Konkurrenz der TNP-ATP-Bindung durch ADP. In einem Perkin-Elmer 650-40 Fluoreszenz-Spektrophotometer wurde  $0.5\ \mu\text{M}$  Rinderherz-COX in Abwesenheit und in Gegenwart eines 100-fachen Überschusses an ADP in der TNP-ATP-Stammlösung mit TNP-ATP titriert. Der Meßpuffer enthielt 10 mM K-Hepes, pH 7.4 sowie 0.005 % Laurylmaltosid. Geschlossene Quadrate: Titration mit TNP-ATP, offene Kreise: Titration mit ADP / TNP-ATP im Verhältnis 100:1.

Bei der Titration von Rinderherz-COX in Gegenwart von ADP konnte eine deutliche Abnahme der maximalen Fluoreszenzzunahme beobachtet werden (Figur 12).

Aus den Daten der Figur 12 läßt sich in einer groben Abschätzung die Affinität der ADP-Bindung an Rinderherz-COX bestimmen. Dazu wird angenommen, das ADP an dieselbe Anzahl von Bindungsstellen bindet, wie TNP-ATP und das diese Bindungsstellen identisch sind.

So ergibt sich für die mittlere Affinität der ADP-Bindungsstellen folgender Ansatz:

Mit einem 100-fachem Überschuß wird etwa 38% der TNP-ATP-Bindung unterbunden (62% der Bindungsstellen bleiben durch TNP-ATP besetzt), daraus folgte für die mittlere  $K_d$  für ADP:

$$K_d (\text{ADP}) = (\text{ADP/TNP-ATP}) * (\% \text{TNP-ATP-Bindung} / \% \text{ADP-Bindung}) * K_d (\text{TNP-ATP})$$

$$K_d (\text{ADP}) = (100 / 1) * (62 / 38) * 0.39 \mu\text{M}$$

$$K_d (\text{ADP}) = \underline{63,6 \mu\text{M}}$$

Die mittlere  $K_d$  von  $0.39 \mu\text{M}$  für die Bindung von TNP-ATP an Rinderherz-COX ergibt sich aus den Daten des Scatchard-Plot aus Figur 9A unter der Annahme, daß alle Bindungsstellen dieselbe Affinität aufweisen.

Diese Abschätzung ist aufgrund der dafür notwendigen Annahmen sehr vage und kann nur zur Bestimmung der Größenordnung der mittleren  $K_d$  für ADP verstanden werden. Es zeigt sich jedoch, daß für COX aus Rinderherz ebenso wie für die meisten nukleotidbindenden Enzyme gilt, daß das Trinitrophenyl-Derivat wesentlich fester gebunden wird als ATP oder ADP.

## 3.2 Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen mittels Filtermethode

Um die Anzahl der Nukleotidbindungsstellen an der COX aus Rinderherz direkt zu bestimmen, wurde eine Filtermethode, bei der radioaktives [ $^{35}\text{S}$ ]ATP $\alpha\text{S}$  bzw. [ $^{35}\text{S}$ ]ADP $\alpha\text{S}$  eingesetzt wurde, verwendet. Der Vorteil dieser Methode gegenüber den Messungen mit TNP-ATP besteht zum einen darin, daß hier kein Nukleotidderivat verwendet wurde, sondern das nativ vorliegende Nukleotid. Zum anderen ist es bei dieser Methodik nicht nötig die erhaltenen Werte indirekt zu kalibrieren, sondern durch Erstellung einer Kalibriergerade mit bekannter Menge radioaktiv markierten Nukleotid ist es möglich direkte Ergebnisse zu erhalten. Bei der Filtermethode wurde das Enzym verschieden lang mit steigenden Mengen radioaktivem Nukleotid inkubiert. Anschließend wurde die enzymhaltige Lösung über ein Filter abgesaugt. Das Filter wurde in Szintillationsflüssigkeit gegeben und in einem Szintillationszähler ausgezählt.

### 3.2.1 Bestimmung der ATP-Bindungsstellen

Bei der Bestimmung der Bindungsstellen für ATP an Rinderherz-COX wurde untersucht, ob deren Anzahl abhängig von der Inkubationszeit war. Dazu wurde die COX-haltige Lösung direkt nach der Zugabe der ATP-Lösung auf ein Filter gegeben und die Flüssigkeit abgesaugt. Das Filter wurde anschließend im Szintillationszähler ausgezählt. In einem zweiten Ansatz wurde COX 30 h bei 0 °C vorinkubiert, bevor die Probe auf das Filter gegeben wurde. Aufgrund der vorher beschriebenen Auswertung (2.17.2) ergab sich, daß die Anzahl der besetzten Bindungsstellen für ATP von der Inkubationszeit abhängt (Figur 13). Bei sofortiger Entfernung der zugegebenen Nukleotide ist keine Sättigung festzustellen, sondern ein niedriger, stetiger Anstieg, der proportional der zugesetzten Menge Nukleotid ist. Bei 30 h Inkubationszeit ist eine Sättigung beobachtbar. Als Endwert der Bindungsfunktion ergab sich, daß Rinderherz-COX  $6.8 \pm 1$  Bindungsstellen für ATP besitzt. Dieser Wert änderte sich auch nicht, wenn man 48 h mit Nukleotiden vorinkubierte. Da die tatsächlich gebundene Menge Nukleotid indirekt bestimmt wurde, indem zuerst über die vorhandene  $^3\text{H}$  - Radioaktivität die unspezifisch gebundene Nukleotidmenge ermittelt wurde, schwankten die Werte relativ stark. Deshalb war eine sinnvolle Auswertung über einen Scatchard-Plot zur Bestimmung der Affinitäten der Bindungsstellen nicht möglich. Aus der Grafik

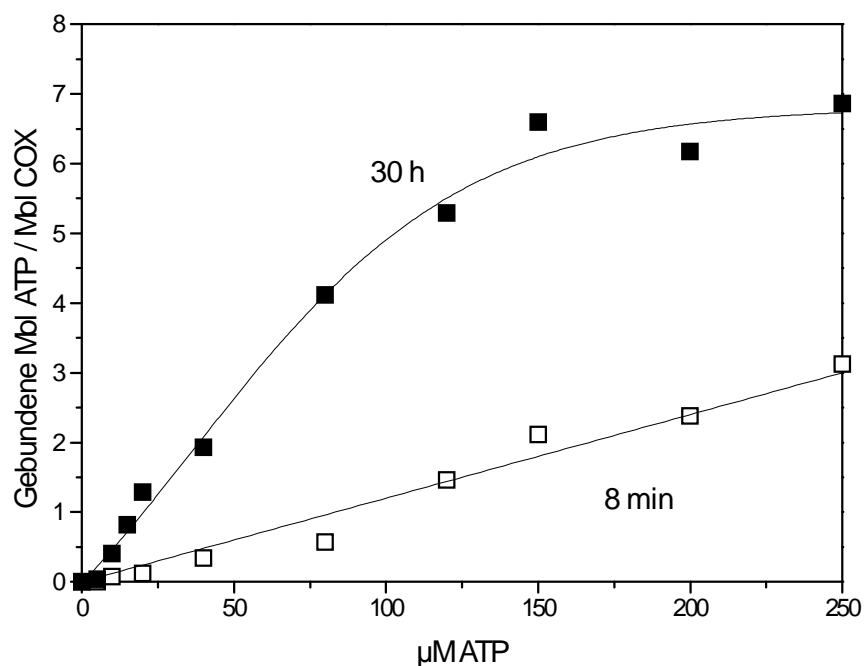
läßt sich jedoch ableiten, das bei einer eingesetzten Nukleotidkonzentration von  $66 \mu\text{M}$   $^{35}\text{S}$ -ATP $\alpha\text{S}$  die Hälfte aller ATP-Bindungsstellen besetzt ist. Aus der eingesetzten Nukleotidkonzentration sowie der Konzentration der COX ergibt sich für die freie Nukleotidkonzentration:

$$[\text{ATP}]_{\text{frei}} = [\text{ATP}]_{\text{Gesamt}} - [\text{ATP}]_{\text{gebunden}} \quad : \text{ mit } [\text{ATP}]_{\text{Gesamt}} = 66 \mu\text{M}$$

$$[\text{ATP}]_{\text{frei}} = [\text{ATP}]_{\text{Gesamt}} - 3.4 * [\text{COX}]$$

$$[\text{ATP}]_{\text{frei}} = 66 \mu\text{M} - 3.4 * 5 = \underline{49.0 \mu\text{M}}$$

Die Konzentration an freiem ATP, bei der die Hälfte aller Bindungsstellen besetzt war, entspricht der mittleren Affinität  $K_d$  dieser Bindungsstellen. Dieser Wert unterscheidet sich von dem durch Gleichgewichtsdialyse ermitteltem  $K_d$ -Wert ( $12.5 \mu\text{M}$ ).

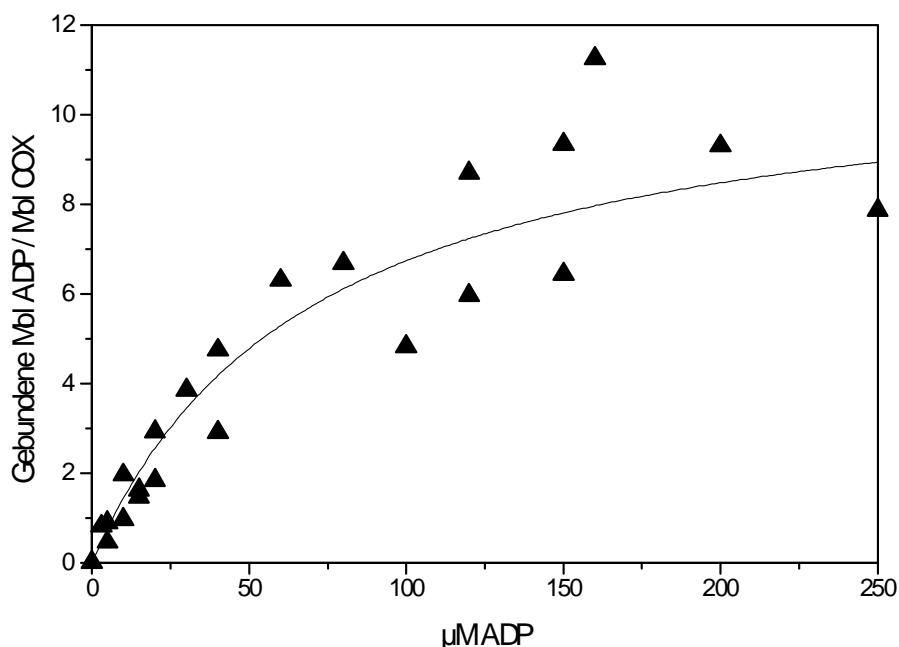


**Figur 13:** Bestimmung der ATP-Bindungsstellen mit der Filtermethode in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.  $5 \mu\text{M}$  Rinderherz-COX, in  $10 \text{ mM}$  K-Hepes,  $\text{pH } 7.4$ ,  $1 \%$  Tween 20, gelöst, wurde mit den angegebenen Mengen  $^{35}\text{S}$ -ATP $\alpha\text{S}$ , für 8 Minuten bei Raumtemperatur (offene Quadrate) oder für 30 h bei  $0^\circ\text{C}$  (geschlossene Quadrate) inkubiert. Der Inkubationspuffer wurde durch Filtration über einen Polysulfonfilter entfernt. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde das Filter in Szintillationsflüssigkeit gegeben und in einem Szintillationszähler ausgewertet. Die einzelnen Kurven repräsentieren den Durchschnitt von vier unabhängigen Meßreihen.

### 3.2.2 Bestimmung der ADP-Bindungsstellen

Da sich gezeigt hat, daß eine Inkubationszeit von 30 h nötig war, um eine Sättigung der ATP-Bindungsstellen zu erreichen, wurde bei der Bestimmung der ADP-Bindungsstellen durch [<sup>35</sup>S]-ADPαS (Herstellung siehe 3.15) ebenfalls für 30 h bei 0 °C vorinkubiert.

Bei der Bestimmung der gebundenen Menge ADP streuten die Meßwerte noch stärker als bei der ATP-Bestimmung, so daß auch hier eine exakte Ermittlung der Anzahl der Bindungsstellen und ihre Affinität nicht möglich war, sondern nur eine grafische Auswertung der gefitteten Funktion möglich war (Figur 14).



**Figur 14:** Bestimmung der ADP-Bindungsstellen mit der Filtermethode. COX (5 µM) wurde mit den angegebenen ADP-Mengen für 30 h bei 0 °C vorinkubiert und anschließend wie bei Figur 13 beschrieben vermessen. Die einzelnen Meßpunkte repräsentieren das Mittel zweier Meßpunkte.

Aus der hyperbolischen Fitfunktion ergab sich für die Anzahl der ADP-Bindungsstellen ein Wert von  $11.4 \pm 2.1$ . Zur Bestimmung der mittleren Affinität der Bindungsstellen wurde dasselbe Verfahren benutzt wie zur Bestimmung der Affinität der ATP-Bindungsstellen:

$$K_d = [\text{ADP}]_{\text{Gesamt}} - 5.7 \cdot [\text{COX}] = 69 - 28.5 = \underline{40.5 \text{ µM}}.$$

**Tabelle 3:** Bestimmung der Anzahl der Bindungsstellen für ATP und ADP, sowie deren Affinitäten, für die Bindung an Rinderherz-COX. Die Daten wurden den Figuren 13 und 14 entnommen.

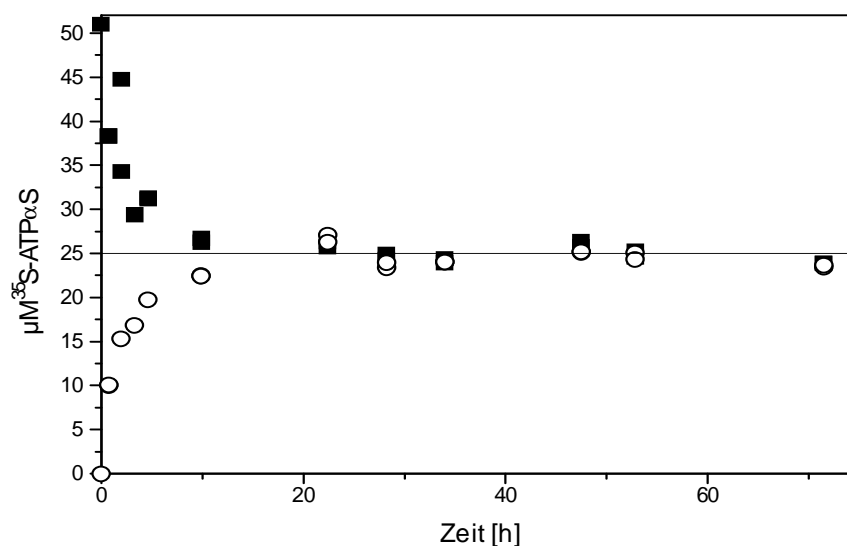
Nukleotid	Mittlere Kd [ $\mu$ M]	Anzahl der Bindungsstellen
ATP	49	$6.81 \pm 0.98$
ADP	41	$11.4 \pm 2.1$

### 3.3 Untersuchung der Bindungsstellen mittels Gleichgewichtsdialyse

Obwohl die Filtermethode bei der Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen zwar Rückschlüsse auf die Zeitabhängigkeit der Bindung zuließ, lieferte sie durch die Streuung der einzelnen Meßwerte keine sehr genauen Daten. Deshalb wurde die Methode der Gleichgewichtsdialyse (Rieger et al., 1995) verwandt, um bessere Daten zu erhalten. Ähnlich wie die Filtermethode bot die Gleichgewichtsdialyse die Möglichkeit direkte ATP- und ADP-Messungen durchzuführen und aufgrund der langen Inkubationszeit wurden auch kryptische Bindungsstellen erkannt.

#### 3.3.1 Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung

Um verlässliche Werte bei der Gleichgewichtsdialyse zu erhalten, ist es notwendig den Zeitpunkt zu bestimmen, bei dem sich das Gleichgewicht zwischen den beiden Zellen der Dialysekammer eingestellt hat.



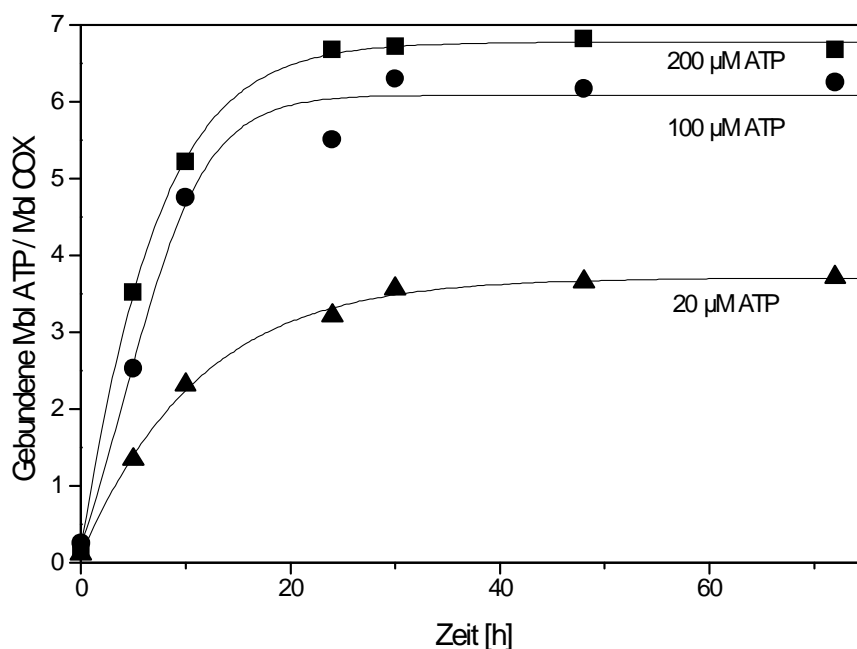
**Figur 15:** Zeitabhängige Gleichgewichtseinstellung bei der Dialyse. Beide Kammern enthielten 100  $\mu\text{L}$  50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 100 mM Kaliumchlorid und 1 % Tween 20. In einer der beiden Meßzellen wurde zusätzlich eine Anfangskonzentration von 50  $\mu\text{M}$   $^{35}\text{S-ATP}\alpha\text{S}$  eingestellt (geschlossene Symbole), während die andere Seite keine Nukleotide zu Beginn enthielt (offene Symbole). Nach der angegebenen Zeit wurde von jeder Kammerseite eine Probe entnommen und im Szintillationszähler vermessen. Die tatsächliche Menge an ATP wurde mittels einer Kalibriergeraden ermittelt.



Figur 15 zeigt die zeitabhängige Einstellung des Dialysegleichgewichts. Danach stellt sich bei den hier gewählten Versuchsbedingungen nach etwa 20 h ein Gleichgewicht zwischen den beiden Seiten der Meßzelle ein.

### 3.3.2 Zeitabhängigkeit der Bindung von ATP an COX

Um die Zeitabhängigkeit der Bindung von ATP an Rinderherz-COX zu untersuchen, wurde die Anzahl der gebundenen ATP-Moleküle pro Molekül COX nach verschiedenen Zeiten gemessen. Dazu wurden in beide Kammern bei der Dialyse dieselbe Anfangskonzentration von radioaktiv markiertem ATP gegeben. Eine der beiden Kammern enthielt zusätzlich COX. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Menge an Nukleotid auf beiden Seiten vermessen und so die Anzahl gebundener Nukleotide bestimmt (Figur 16). Aus den Daten geht hervor, daß bei ATP-Konzentrationen von 200  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  das Gleichgewicht bereits nach etwa 24 h eingestellt war, während bei der Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  die Einstellung des Gleichgewichts länger dauerte und erst nach 30 h vollständig eingestellt war.

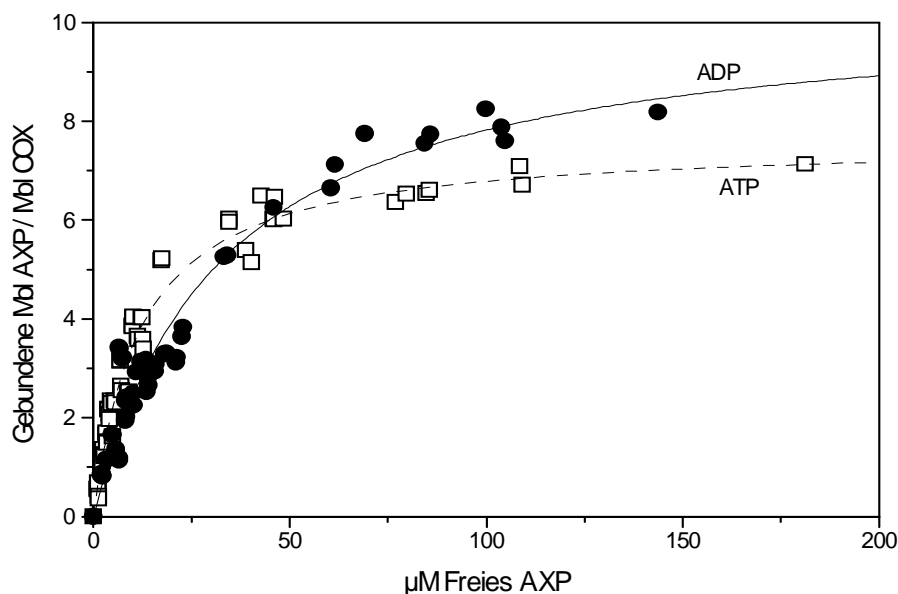


**Figur 16:** Messung der zeitabhängigen Gleichgewichtseinstellung für die Bindung von ATP an COX. Die Dialysekammern enthielten auf beiden Seiten 100  $\mu\text{L}$  50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, mit 100 mM KCl, 1 % Tween 20, sowie die angegebenen Mengen  $^{35}\text{S}$ -ATP $\alpha\text{S}$ . In jeweils einer Kammerhälfte befand sich zusätzlich 5  $\mu\text{M}$  Rinderherz-COX. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler vermessen.

Da der Zeitpunkt der Einstellung des Gleichgewichts der ATP-Bindung nicht nur von der Einstellung des Gleichgewichts der Dialyse (Figur 15) abhing, sondern auch von der Konzentration des ATP, wurde die Inkubationszeit in den folgenden Versuchen auf 3 Tage erhöht, um auch bei kleineren Nukleotidkonzentrationen sicher zu sein, daß sich das Bindungsgleichgewicht eingestellt hatte.

### 3.3.3 Messung der ATP- und ADP-Bindungsstellen

Zur Bestimmung der Anzahl der ATP-Bindungsstellen wurde Rinderherz-COX mit radioaktiv markiertem ATP für 72 h bei 0 °C inkubiert. Dabei wurden ATP-Konzentrationen in einem Bereich von 0 - 250  $\mu\text{M}$   $^{35}\text{S}$ -ATP $\alpha\text{S}$  eingesetzt. Aufgrund der erhaltenen Daten ergab sich eine Sättigungskurve für die Bindung von ATP, deren Maximum bei etwa 7 Bindungsstellen pro Molekül COX lag (Figur 17).



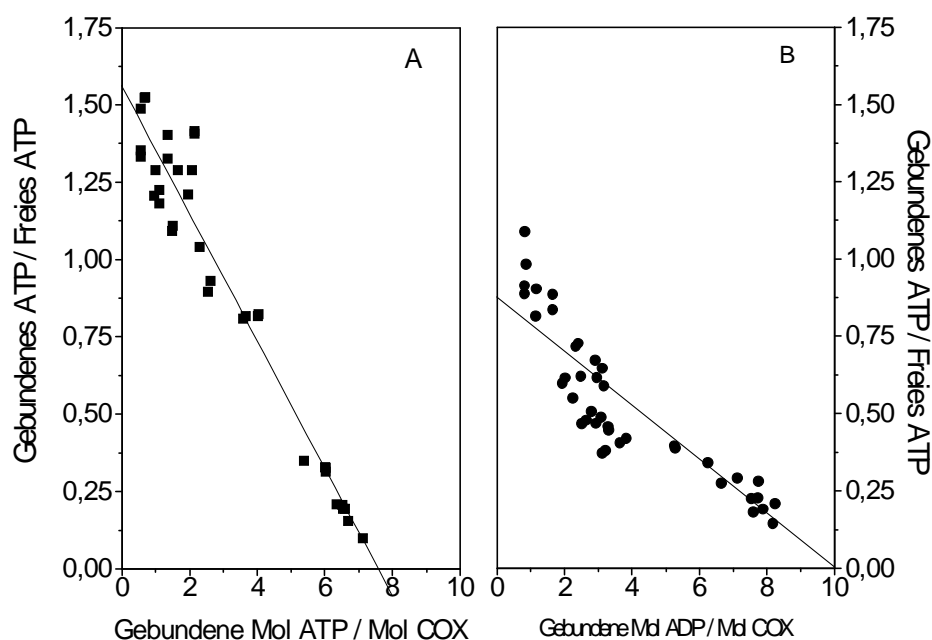
**Figur 17:** Bestimmung der Bindungsstellen für ATP und ADP mit  $^{35}\text{S}$ -ATP $\alpha\text{S}$  bzw.  $^{35}\text{S}$ -ADP $\alpha\text{S}$  durch Einsatz der Gleichgewichtsdialyse. Beide Kammern enthielten 100  $\mu\text{L}$  50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 100 mM KCl, 1 % Tween 20 sowie verschiedene Konzentrationen des angegebenen Nukleotids in einem Bereich von 0 - 250  $\mu\text{M}$ . Eine der beiden Dialysekammern enthielt jeweils 5  $\mu\text{M}$  Rinderherz-COX. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 0 °C wurde die Proben im Szintillationszähler vermessen. Aus der COX-freien Dialysekammer ergab sich die Konzentration des freien Nukleotids, aus der Differenz zwischen COX-haltiger und COX-freier Kammer die gebundene Menge an Nukleotid. Die Daten resultieren aus sechs unabhängigen Meßreihen.

Analoge Studien wurden für die Bindung von ADP durchgeführt. Die Herstellung des radioaktiven  $^{35}\text{S}$ -ADP $\alpha$ S erfolgte durch Umsetzung von  $^{35}\text{S}$ -ATP $\alpha$ S mit Hexokinase (2.16.).

Die Bindungsstudien von ADP an COX wurden in einem Konzentrationsbereich von 0 - 200  $\mu\text{M}$  eingesetztem ADP durchgeführt. Auch für die Bindung von ADP ergab sich eine Sättigungsfunktion, deren Endwert aber höher lag als der der ATP-Bindung (Figur 17). Während bei der Bindung von ATP bei einer freien Nukleotidkonzentration von etwa 50  $\mu\text{M}$  bereits eine Sättigung zu beobachten war, war im Falle der ADP-Bindung kein eindeutiger Beginn der Sättigungsphase festzustellen. Dies spricht dafür, daß einige der ADP-Bindungsstellen eine deutlich niedrigere Affinität besitzen und erst bei höheren Konzentrationen abgesättigt werden.

Zur Bestimmung der genauen Anzahl der Bindungsstellen für ATP bzw. ADP wurden aus den Daten der Figur 17 Scatchard-Plots angefertigt (Figur 18).

Für die Bindung von ATP an COX ergab der Scatchard-Plot, daß es 7 Bindungsstellen pro COX-Molekül gibt, die eine mittlere Affinität von 12.5  $\mu\text{M}$  haben.



**Figur 18:** Scatchardplots für die Bindung von  $^{35}\text{S}$ -ATP $\alpha$ S (A) und  $^{35}\text{S}$ -ADP $\alpha$ S (B) an Rinderherz-COX. Die Daten wurden der Figur 17 entnommen.

Der Scatchard-Plot, der die Daten der ADP-Bindung enthielt, schien eine Zweiphasigkeit aufzuweisen. Da es aber nicht sinnvoll ist bei mehr als 2-3 verschiedenen Bindungsstellen einzelne Affinitäten zu bestimmen, wurde der Plot

linear ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl der ADP-Bindungsstellen mit 10 bestimmt, deren mittlere Affinität bei 28  $\mu\text{M}$  lagen (Tabelle 4).

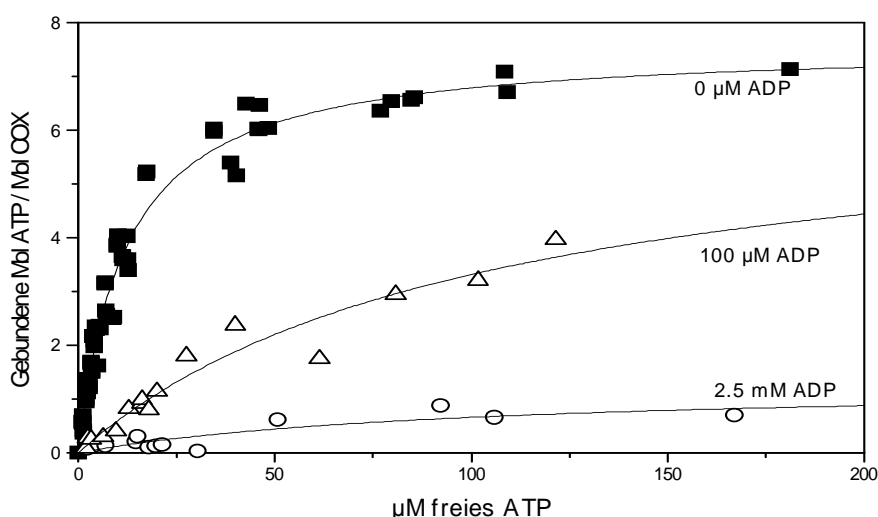
**Tabelle 4:** Bestimmung der Anzahl der Bindungsstellen für ATP und ADP, sowie deren Affinitäten, für die Bindung an Rinderherz-COX mittels Gleichgewichtsdialyse. Die Daten wurden der Figur 18 entnommen.

Nukleotid	Mittlere $K_d$ [ $\mu\text{M}$ ]	Anzahl der Bindungsstellen
ATP	$12.5 \pm 1.9$	$7.3 \pm 0.5$
ADP	$28.5 \pm 3$	$10.1 \pm 1.1$

### 3.3.4 Konkurrenz der ATP- und ADP-Bindungsstellen

Die hohe Anzahl der ATP- und ADP-Bindungsstellen und insbesondere die Unterschiede in der Anzahl ließ die Frage offen, ob es sich um unabhängige Bindungsstellen für ATP oder ADP handelt oder ob sich die Bindung eines Nukleotids durch die Gegenwart des anderen beeinflussen läßt.

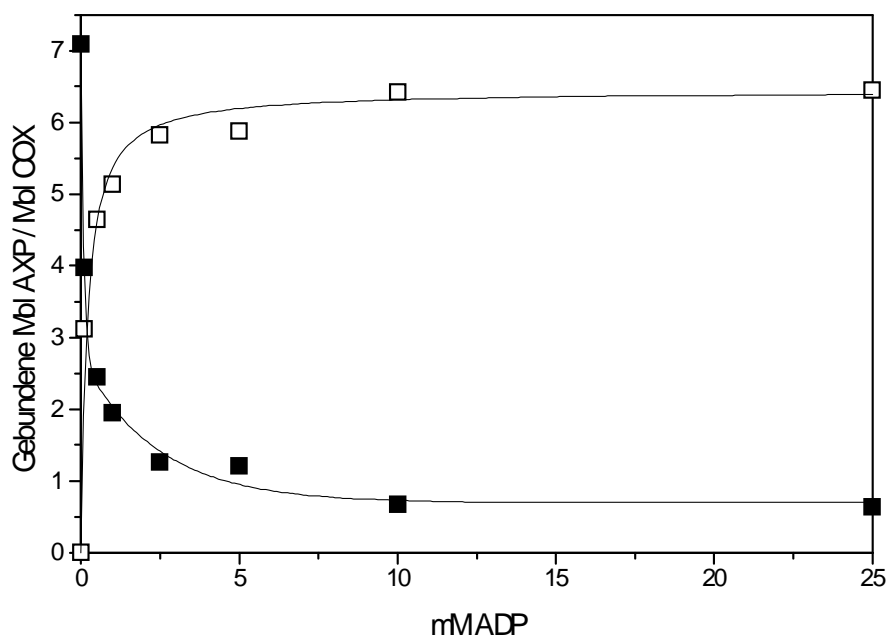
Dazu wurden die ATP-Bindungsstudien in Gegenwart verschiedener Mengen nicht markiertem ADP durchgeführt (Figur 19).



**Figur 19:** ATP-Bindungsstudie mittels Gleichgewichtsdialyse in Gegenwart verschiedener konstanter ADP-Mengen. Die Meßzellen enthielten jeweils 100  $\mu\text{L}$  50 mM Natriumphosphat, pH 7.4 mit 100 mM KCl, 1 % Tween 20, 0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 2.5 mM ADP sowie unterschiedliche Mengen [ $^{35}\text{S}$ ]-ATP $\alpha\text{S}$  in einem Bereich von 0 -250  $\mu\text{M}$ . Eine Seite der Dialysekammer enthielt zusätzlich 5  $\mu\text{M}$  Rinderherz-COX. Nach 72 h Inkubation bei 0  $^{\circ}\text{C}$  wurden die Proben im Szintillationszähler vermessen

Deutlich sichtbar nahm bereits in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ADP die gebundene Menge an radioaktivem ATP ab. Bei einer Konzentration von 2.5 mM ADP wurde die Bindung des ATP fast vollständig unterdrückt.

Um genauer zu bestimmen, ob alle ATP-Bindungsstellen auch von ADP besetzt werden, wurden bei einer konstanten, radioaktiven ATP-Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  verschiedene Mengen an ADP zugesetzt, inkubiert und vermessen. Die ADP-Konzentration betrug dabei bis zu 25 mM (Figur 20).



**Figur 20:** Konkurrenz der Bindung von radioaktivem ATP mit nichtmarkiertem ADP bei konstanter ATP-Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  und variabler ADP-Konzentration. Die Versuchsdurchführung entsprach der von Figur 19. Die geschlossenen Quadrate entsprechen der gemessenen Anzahl belegter ATP-Bindungsstellen. Die offenen Quadrate entsprechen der Differenz zwischen gebundenem ATP ohne Anwesenheit von ADP bei einer ATP-Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  und der gemessenen ATP-Menge bei angezeigter ADP-Konzentration.

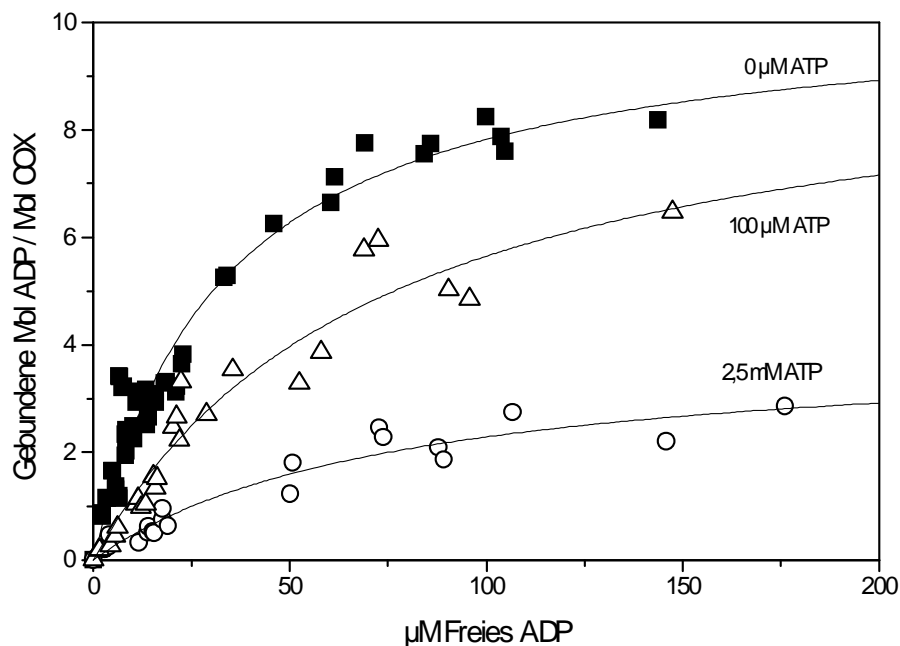
Die Bindung von radioaktiv markiertem ATP geht mit steigender ADP-Konzentration zurück, so daß bei einer ADP/ATP - Verhältnis von 200 : 1 nur noch etwa 0.6 Mol ATP pro Mol COX gebunden werden.

Analog dazu wurde versucht, die Bindung von ADP durch ATP zu kompetitieren. Dazu wurden Messungen der ADP-Bindung mit [ $^{35}\text{S}$ ]ADP $\alpha$ S in Gegenwart von ATP durchgeführt (Figur 21).

Ähnlich wie bei der Konkurrenz von ATP mit ADP wird hierbei eine Abnahme der Bindung von ADP beobachtet. Jedoch ist die Abnahme der ADP-Bindung in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ATP trotz der höheren mittleren Affinität für ATP (Tabelle

4) geringer als bei der entsprechenden ATP-Kompetition durch ADP (Figur 19). So sind, wie aus Figur 21 deutlich wird, in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ATP maximal nur etwa 2 Moleküle ADP pro Molekül COX weniger gebunden, während bei der entsprechenden ATP-Kompetition die maximale Bindung um 3 Moleküle ATP pro Molekül COX abgenommen hat.

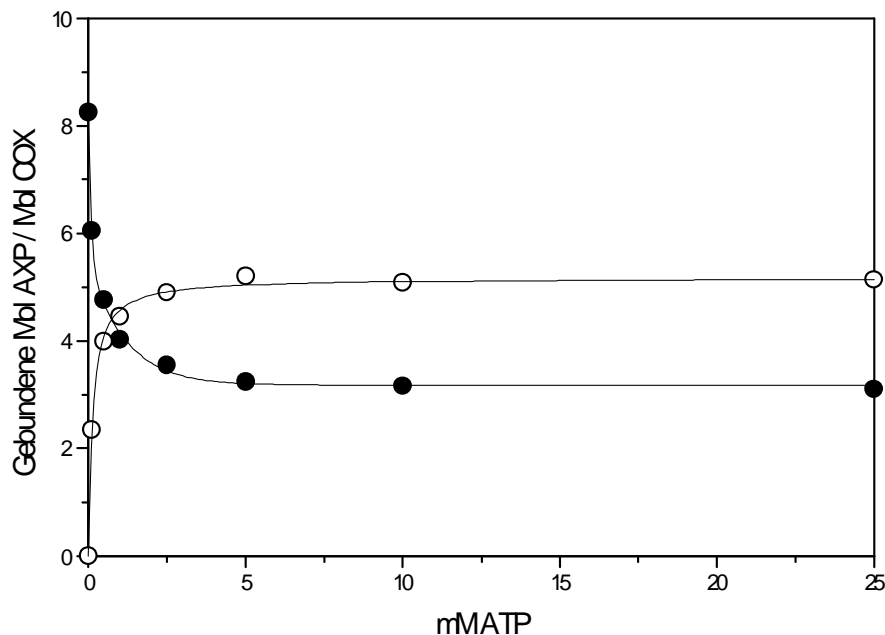
Selbst in Gegenwart von 2.5 mM ATP werden noch beträchtliche Mengen ADP an die COX gebunden (Figur 21).



**Figur 21:** ADP-Bindungsstudie mittels Gleichgewichtsdialyse in Gegenwart verschiedener konstanter ATP-Mengen. Die Meßzellen enthielten jeweils 100  $\mu\text{L}$  50 mM Natriumphosphat, pH 7.4 mit 100 mM KCl, 1 % Tween 20, 0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 2.5 mM ATP sowie unterschiedliche Mengen [ $^{35}\text{S}$ ]-ADP $\alpha\text{S}$  in einem Bereich von 0 - 250  $\mu\text{M}$ . Eine Seite der Dialysekammer enthielt zusätzlich 5  $\mu\text{M}$  Rinderherz-COX. Nach 72 h Inkubation bei 0  $^{\circ}\text{C}$  wurden die Proben im Szintillationszähler vermessen.

Zur genaueren Bestimmung wurden auch für die Kompetition von ADP durch ATP Versuche bei einer konstanten ADP-Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  mit steigender ATP-Konzentration durchgeführt. Die maximale ATP-Konzentration betrug dabei 25 mM (Figur 22).

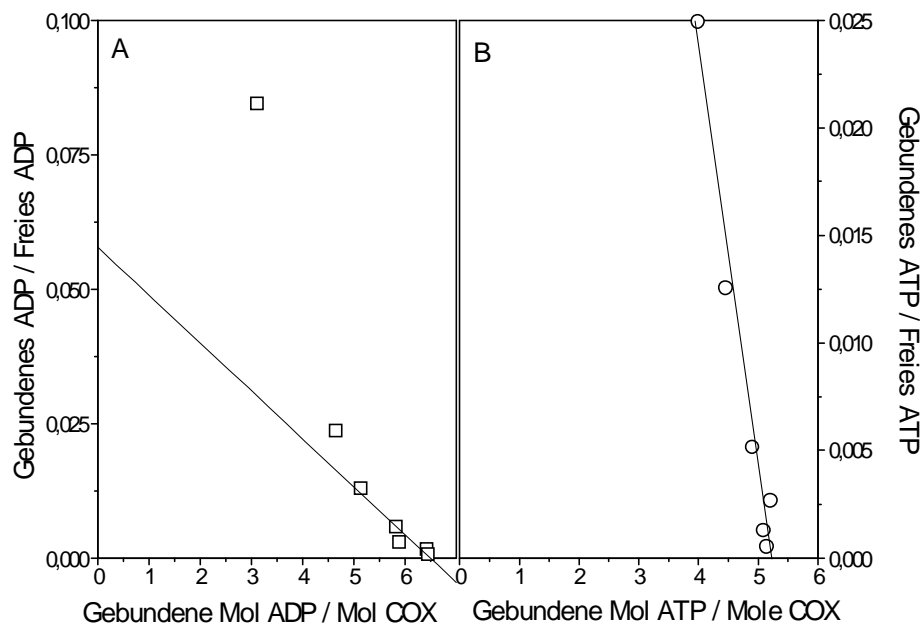
Deutlich sichtbar zeigten diese Messungen, daß selbst bei hohen ATP-Konzentrationen nicht alle ADP-Bindungsstellen kompetitiert werden konnten. Selbst bei einem ATP/ADP-Verhältnis von 200 : 1 sind noch etwa 3 Moleküle ADP pro Molekül COX gebunden.



**Figur 22:** Konkurrenz der Bindung von [ $^{35}\text{S}$ ]-ADP $\alpha$ S mit ATP bei konstanter ADP-Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  und steigender ATP-Menge. Die Versuchsdurchführung entsprach der von Figur 21. Die geschlossenen Kreise entsprechen der gemessenen Anzahl belegter ADP-Bindungsstellen. Die offenen Kreise entsprechen der Differenz zwischen gebundenem ADP ohne Anwesenheit von ATP bei einer ADP-Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  und der gemessenen ADP-Menge bei angezeigter ATP-Konzentration.

Aus der Bestimmung der gebundenen radioaktiven Nukleotide ließen sich Differenzkurven bestimmen, die angaben, wieviele der Bindungsstellen durch den Kompetitor besetzt waren (offene Symbole in den Figuren 20 und 22). Von diesen Daten ließen sich Scatchard-ähnliche Plots erstellen. Durch Ermittlung des Schnittpunktes der Geraden mit der x-Achse läßt sich bestimmen, wieviele Bindungsstellen sich durch den Kompetitor besetzen lassen (Figur 23).

Für die Konkurrenz von ATP durch ADP konnte ermittelt werden, daß etwa 6,5 Moleküle ADP anstelle des ATP gebunden werden können (Tabelle 5). Da der Fehler der Auswertung anhand stark streuender Daten relativ groß war, kann davon ausgegangen werden, daß alle 7 ATP-Bindungsstellen durch ADP ausgetauscht werden können.



**Figur 23:** Eine Scatchard-ähnliche Auwertung der kompetitiven Bindungen. Dazu wurden die Anzahl der durch den Kompetitor besetzten Bindungsstellen zur Berechnung der benötigten Parameter aus den Figuren 20 und 22 (offene Symbole) entnommen.

Bei der Betrachtung der Verdrängung von ADP durch ATP ergaben sich einige Probleme. Durch die niedrigere mittlere Affinität der ADP-Bindungsstellen kam es, daß bei der gewählten ADP-Konzentration noch nicht alle Bindungsstellen abgesättigt waren. Da dies aber erst bei Konzentrationen oberhalb von 1 mM ADP annähernd geschieht, war eine Betrachtung der Kompetition in diesem Bereich nicht sinnvoll. Um die Kompetition zu beobachten, sollten Verhältnisse von ATP/ADP von 100 : 1 und mehr untersucht werden können. In diesen Fällen unterscheidet sich die Ionenstärke der Lösung jedoch sehr stark von der ohne ATP, so daß eine Beeinflussung der Bindung durch diese Veränderung nicht mehr ausgeschlossen werden konnte. Durch die Wahl der ADP-Konzentration von 125  $\mu$ M war dies jedoch nicht zu befürchten, jedoch konnte hier nur bestimmt werden, wieviele der bereits besetzten ADP-Bindungsstellen durch ATP ersetzt werden konnten.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen ergab sich aus Figur 23 B, daß etwa 5.2 der durchschnittlich 8.15 in Abwesenheit von ATP besetzten ADP-Bindungsstellen durch ATP kompetitiert werden können (Tabelle 5). Dies zeigte, daß etwa 3 der Bindungsstellen für ADP auch bei hohen ATP-Konzentration nicht mit ATP austauschen können.



Eine Bestimmung der Bindungskonstanten war aus diesen Plots nicht möglich, da das Verhältnis Substrat zu Kompetitor nicht konstant war, sondern mit steigender Kompetitorkonzentration fiel.

**Tabelle 5:** Bestimmung der kompetitibaren Nukleotidbindungsstellen an Rinderherz-COX. Die Daten der zweiten Spalte entstammen den Figuren 20 und 22, wenn kein Kompetitor zugegeben war. Die Daten der dritten Spalte wurden der Figur 23 entnommen.

Nukleotid	Anzahl der maximal besetzten Bindungsstellen bei 125 $\mu$ M Substratkonzentration	Anzahl der kompetitibaren Bindungsstellen
ATP	7.05	$6.5 \pm 2.5$
ADP	8.15	$5.2 \pm 1.0$

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Bindungsstudien

Für die Bindung des ATP-Derivats TNP-ATP konnten 3 Bindungsstellen bestimmt werden, die sowohl beim Enzym aus Rinderleber als auch beim Enzym aus Rinderherz vorhanden sind. Die Bindung von TNP-ATP konnte durch Gegenwart eines Antikörpers gegen die Untereinheit VIa-H aus Rinderherz-COX nicht unterbunden werden. Durch einen Trypsinverdau wurden zwei der Bindungsstellen am Rinderherzenzym entfernt, wodurch diese beiden Bindungsstellen an den Untereinheiten IV, VIa, VIb, VIIa, VIIb oder VIII lokalisiert sein dürften, da diese Untereinheiten durch den Verdau abgespalten werden. Die dritte Bindungsstelle sollte an der Untereinheit I oder II lokalisiert werden, da beim 2 Untereinheiten Enzym aus *Paracoccus denitrificans* die Bindung eines Moleküls TNP-ATP pro Molekül COX gefunden werden konnte (Figur 7).

Durch verschiedene Inkubationszeiten konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der gebundenen TNP-ATP-Moleküle nicht zeitabhängig war.

Durch die Filtermethode konnte die Anzahl von 7 Bindungsstellen am Rinderherzenzym (Rieger et al., 1995) bestätigt werden (Figur 13), jedoch mit geringfügig niedrigerer Affinität. Für ADP wurde sogar die Anzahl von 11 Bindungsstellen gefunden (Figur 14). Jedoch waren beide Messungen durch die indirekte Bestimmung der spezifisch gebundenen Radioaktivität sehr ungenau.

Es konnte jedoch mit der Filtermethode eindeutig belegt werden, daß die Anzahl der gebundenen ATP-Moleküle abhängig von der Inkubationszeit ist, es also kryptische Bindungsstellen am isolierten Enzym gibt (Figur 13).

Durch die Gleichgewichtsdialyse konnten ebenfalls 7 Bindungsstellen für ATP am Rinderherzenzym bestimmt werden. Auch mit der Gleichgewichtsdialyse ergaben die Messungen eine höhere Anzahl von spezifisch gebundenem ADP. Mit dieser Methode wurden 10 ADP-Bindungsstellen bestimmt (Figur 17).

Durch Kompetitionsversuche konnte gezeigt werden, daß 7 Bindungsstellen in der Lage sind sowohl ATP als auch ADP zu binden. Hingegen scheinen am Enzym 3 Bindungsstellen vorhanden zu sein, die selektiv ADP erkennen (Figur 20 und 22).

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Bindungsstudien. Die Daten entstammen den Tabellen 2 - 5.

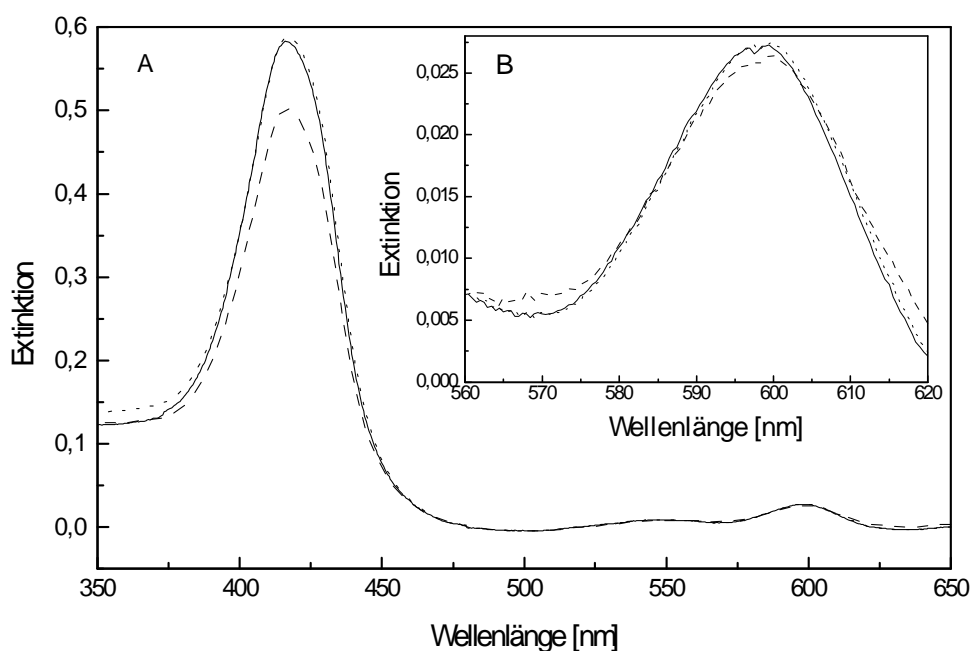
Methode	Enzym aus	Nukleotid	$K_d$ [ $\mu$ M]	Anzahl der Bindungsstellen
Fluoreszenz-spektroskopie	Rinderherz	TNP-ATP	$0.20 \pm 0.03$ (2x) $0.94 \pm 0.05$ (1x)	$2.96 \pm 0.33$
	Rinderleber	TNP-ATP	$0.26 \pm 0.03$ (2x) $0.93 \pm 0.05$ (1x)	$2.93 \pm 0.26$
	Rinderherz, trypsinverdaut	TNP-ATP	$0.28 \pm 0.04$	$0.99 \pm 0.11$
	Paracoccus denitrificans (2 UE)	TNP-ATP	$3.6 \pm 0.5$	$1.11 \pm 0.20$
TNP-ATP / Kompetition	Rinderherz	ADP	63.6	nicht bestimmbar
Filtermethode	Rinderherz	$^{35}$ S-ATP $\alpha$ S	49	$6.81 \pm 0.98$
	Rinderherz	$^{35}$ S-ADP $\alpha$ S	41	$11.4 \pm 2.1$
Gleichgewichts- dialyse	Rinderherz	$^{35}$ S-ATP $\alpha$ S	$12.5 \pm 1.9$	$7.3 \pm 0.5$
	Rinderherz	$^{35}$ S-ADP $\alpha$ S	$28.5 \pm 3$	$10.1 \pm 1.1$
Kompetition	Rinderherz	$^{35}$ S-ATP $\alpha$ S ADP		7 von 7
		$^{35}$ S-ADP $\alpha$ S ATP		5 von 8

### 3.5 Photometrische Untersuchungen von Nukleotideffekten

#### 3.5.1 Wirkung von ATP und ADP auf das Spektrum der COX

In dem ersten Teil dieser Dissertation wurde untersucht, wieviele Adeninnukleotide an COX aus verschiedenen Geweben und Organismen binden, sowie mit welcher Affinität. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Suche nach Funktionen der Bindung von Nukleotiden.

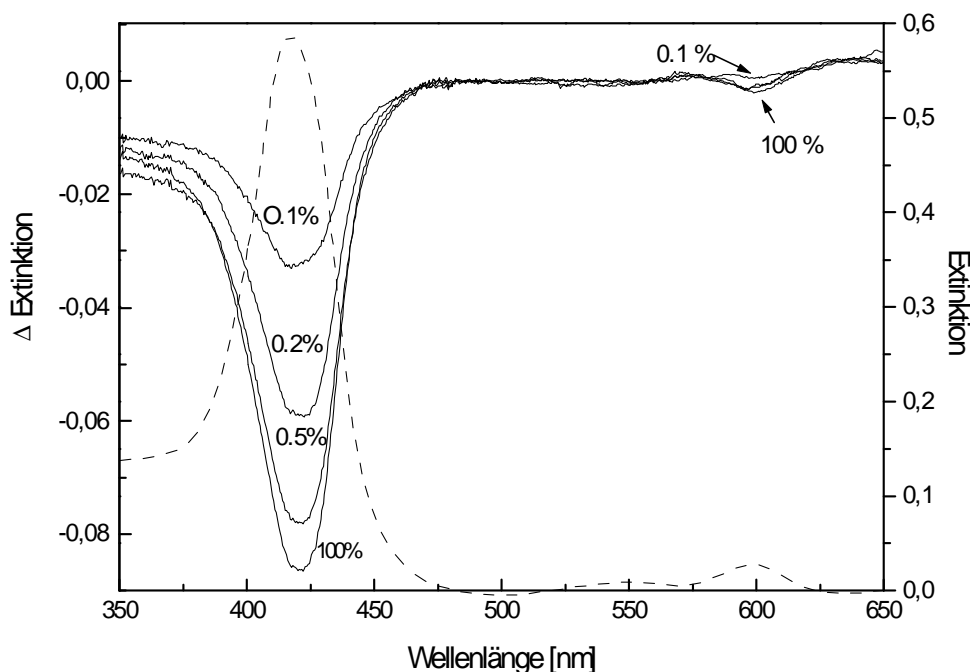
Wenn Nukleotide einen regulatorischen Effekt auf die Aktivität oder die  $H^+/e^-$  Stöchiometrie haben, so ist es möglich, daß man dies durch Veränderungen im Spektrum beobachten kann. Um nach Veränderungen zu suchen, wurde COX mit ATP und ADP inkubiert und nach 24 h im Photometer vermessen.



**Figur 24:** Absolutspektren von COX in Abwesenheit von Nukleotiden (durchgezogene Linie), in Gegenwart von ATP (gepunktete Linie) oder ADP (unterbrochene Linie). 3  $\mu$ M Rinderherz-COX wurde in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA und 1 % Tween 20 mit 5 mM ATP, 5 mM ADP oder ohne Nukleotid für 24 h bei 0 °C inkubiert und anschließend photometrisch vermessen. A: Spektren von 350 nm - 650 nm, B: Ausschnitt von 560 nm - 620 nm.

Während die ATP-inkubierte COX ein Spektrum ergab, das nahezu identisch mit dem unbehandelten COX war, wurde in Gegenwart von ADP eine Erniedrigung der  $\gamma$ -Bande sowie eine Verschiebung der  $\alpha$ -Bande beobachtet (Figur 24).

Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von ADP und ATP auf das Spektrum der COX, wurde das Enzym mit verschiedenen ATP/ADP-Verhältnissen, bei konstanter Gesamtnukleotidkonzentration, inkubiert. Anschließend wurden die Proben photometrisch vermessen, wobei das ATP-inkubierte Enzym als Referenz diente (Figur 25).



**Figur 25:** Spektrale Änderungen der COX aus Rinderherz in Gegenwart von ADP und ATP. Die Differenzspektren ( $\Delta$ Extinktion) wurde mit 100 % ATP (5 mM) in der Referenzküvette gemessen, während sich in der Probenküvette die angezeigten ADP - Anteile befanden. Die Gesamtkonzentration an Nukleotiden betrug immer 5 mM. Vor der Messung wurden 3  $\mu$ M COX mit den Nukleotiden in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA und 1% Tween 20 für 24 h bei 0 °C inkubiert. Das Absolutspektrum (Extinktion) der oxidierten ATP-haltigen COX ist durch die gepunktete Linie wiedergegeben.

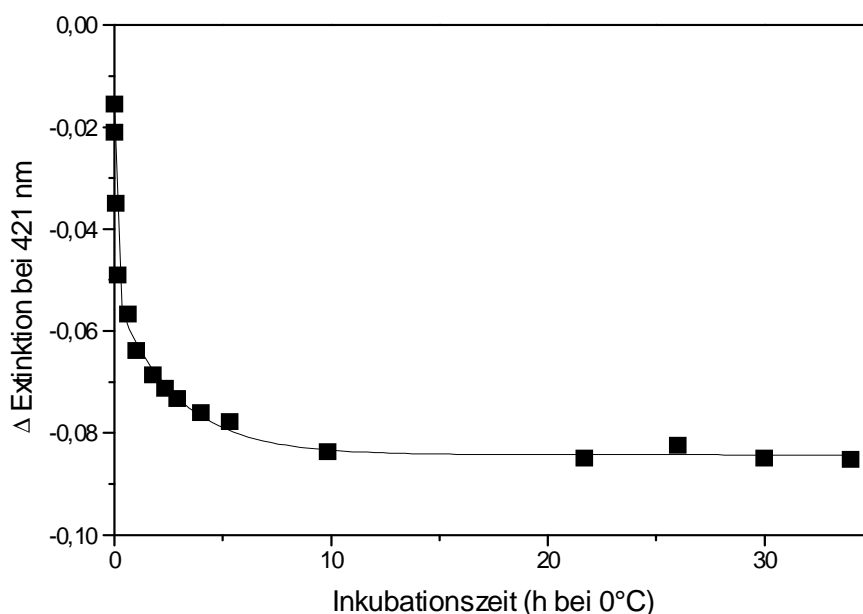
Bei den Messungen mit verschiedenen ADP-Anteilen zeigte sich, daß bereits bei geringen ADP-Anteilen eine deutliche Erniedrigung der  $\gamma$ -Bande zu beobachten war.

Analoge Messungen wurden auch am Rinderleberenzym durchgeführt. Dabei traten keinerlei Unterschiede zum Herzenzym auf, so daß auf eine nähere Untersuchung dieses Enzyms verzichtet wurde, da die Ausbildung der Isoformen

einiger Untereinheiten keinerlei Wirkung auf die spektralen Effekte von Nukleotiden hatte.

### 3.5.2 Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Nukleotideffekte

Da bereits bei der Bestimmung der Anzahl der ATP-Bindungsstellen Hinweise dafür auftraten, daß es kryptische Bindungsstellen an isolierter COX gibt, an die erst nach einiger Zeit Nukleotide gebunden werden (Figur 13 und 16), wurde untersucht, ob sich für die spektralen Änderungen eine Zeitabhängigkeit beobachten ließ. Dazu wurde COX, die mit 5 mM ADP inkubiert wurde, nach verschiedenen Inkubationszeiten gegen COX, die zeitgleich mit 5 mM ATP inkubierte, vermessen (Figur 26).

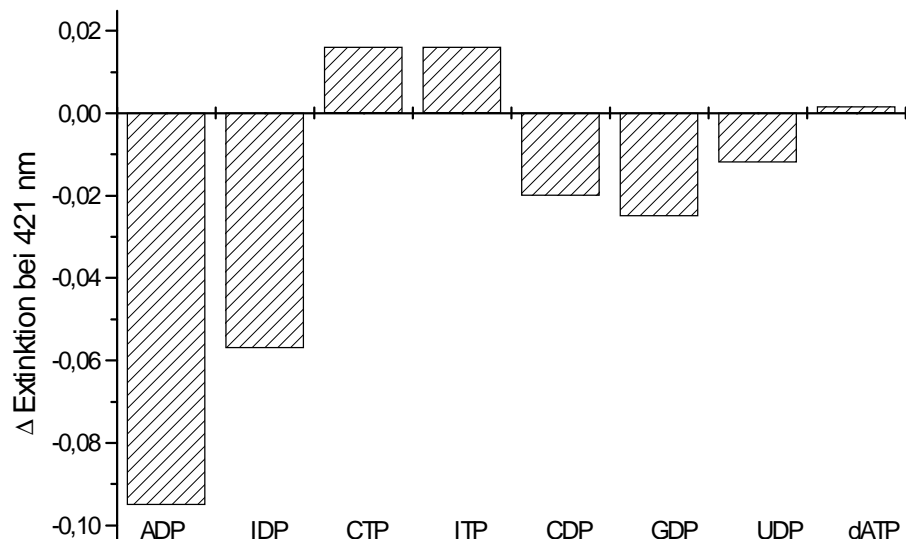


**Figur 26:** Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Extinktionsänderung bei 421 nm bei Anwesenheit von 5 mM ADP. 3  $\mu$ M Rinderherz-COX wurde in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 % Tween 20 mit 5 mM ADP bei 0 °C inkubiert. Als Referenz wurde COX unter denselben Bedingungen mit 5 mM ATP inkubiert. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden Differenzspektren zwischen der ADP-haltigen und der ATP-haltigen COX aufgenommen. Aufgetragen wurde das Differenzmaximum bei 421 nm.

Die maximale Extinktionsdifferenz wurde erst nach einer Inkubationszeit von mehr als 10 h sichtbar, wobei  $t_{1/2}$  etwa eine Stunde betrug. Die Dauer der vollständigen Ausbildung des Differenzminimums ist innerhalb einer COX-Präparation konstant, variiert jedoch zwischen verschiedenen Präparationen zwischen 5 und 20 h.

### 3.5.3 Untersuchung der Wirkung anderer Nukleotide

Um die Spezifität der ATP/ADP - Effekte auf das Spektrum der Cytochrome c Oxidase näher zu untersuchen, wurde die COX mit anderen Nukleotiden inkubiert, wobei die Vorgehensweise analog der ATP/ADP - Messungen war. Als Referenz wurde dabei COX vermessen, die mit ATP inkubiert worden war, da dieses Spektrum der unbehandelten COX entsprach.

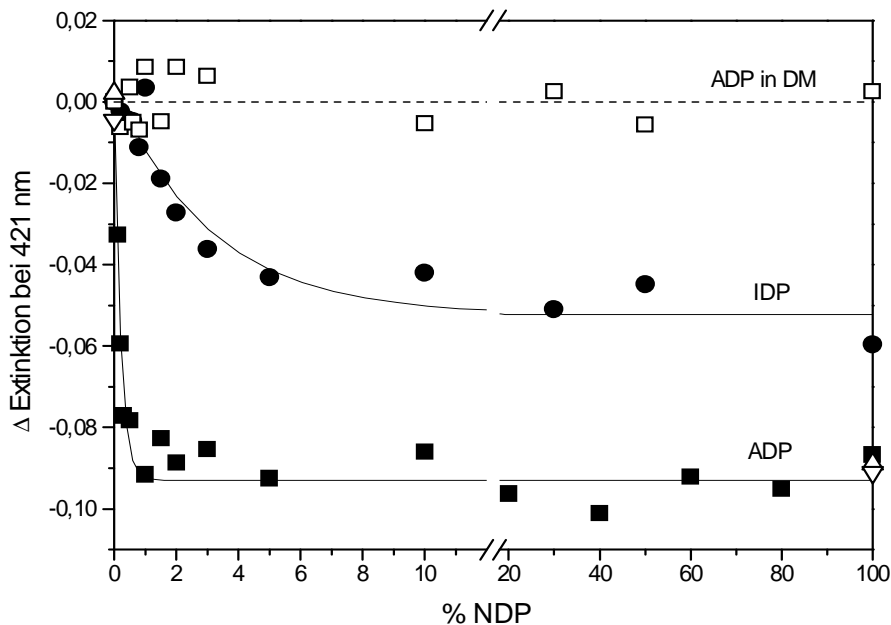


**Figur 27:** Bestimmung der Spezifität der spektralen Wirkung von Nukleotiden auf Rinderherz-COX. Die Referenzküvette enthielt mit 5 mM ATP inkubierte COX, die Probenküvette enthielt Enzym, das mit 5 mM des angegebenen Nukleotids inkubiert wurde. Alle Proben wurden für 24 h mit dem jeweiligen Nukleotid in 50 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA und 1% Tween 20 bei 0 °C inkubiert. Die Proben wurden photometrisch vermessen und es wurden die Differenzmaxima bei 421 nm ermittelt.

Die Triphosphate CTP und ITP sowie die Diphosphate CDP, GDP, UDP hatten dabei keinen größeren Einfluß auf die Differenzspektren, ebenso wie das Desoxyribonukleosid dATP (Figur 27). Das einzige Nukleotid, daß außer ADP eine Wirkung auf die  $\gamma$ -Bande hatte, war IDP. Jedoch war die Extinktionsdifferenz nur wenig größer als die Hälfte der Änderung, die auftrat, wenn ADP-inkubierte COX gegen ATP-inkubierte COX vermessen wurde (Figur 27).

### 3.5.4 Bestimmung der Spezifität von ADP und IDP

Das außer ADP nur noch IDP eine spektrale Änderung bewirkt, mag daher rühren, das IDP dem ADP von der Struktur am nächsten kommt, wobei die 6-Aminogruppe des Adenosin durch ein doppelt gebundenen Sauerstoff ersetzt wurde.



**Figur 28:** Änderung der Extinktion von COX aus Rinderherz bei 421nm nach Inkubation mit Nukleotiden für 24 h in Gegenwart verschiedener Detergenzien. Als Referenz wurde mit ATP inkubierte COX genommen. Die Proben enthielten die angegebenen Prozentgehalte ADP oder IDP sowie ATP bei einer totalen Nukleotidkonzentration von 5 mM. Der Inkubationspuffer enthielt 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4 und 1mM EDTA. Geschlossene Quadrate: Steigende Mengen ADP in 1 % Tween 20; offene Quadrate: Steigende Mengen ADP in 0.5 % Dodecylmaltosid (Laurylmaltosid); geschlossene Kreise: Steigende Mengen IDP in 1 % Tween 20; Dreiecke: Inkubation des Enzyms mit 3 Mol / Mol monoklonalem Antikörpern gegen die Untereinheit IV der COX (aufwärtsgerichtete Dreiecke) oder gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc der COX (abwärtsgerichtete Dreiecke) sowie ADP oder ATP. Inkubiert und vermessen wurde wie bei Figur 27 beschrieben.

Um die spektralen Effekte genauer zu untersuchen, wurden Differenzspektren von COX bei verschiedenen ATP/ADP - bzw ATP/IDP - Verhältnissen aufgenommen, wobei die Gesamtkonzentration an Nukleotiden konstant 5 mM betrug. Die Referenzküvette enthielt dabei immer mit der entsprechenden Menge ATP inkubierte COX (Figur 28).

Gleichzeitig wurde untersucht, ob die spektralen Unterschiede in Gegenwart eines anderen Detergenzes erhalten blieben. Dazu wurde die COX nicht in



Gegenwart von 1 % Tween 20 inkubiert, sondern es wurde als Detergenz 0.5 % Dodecylmaltosid verwendet (Figur 28).

Um Zusammenhänge zwischen den spektralen Auswirkungen der Nukleotide und bestimmten Untereinheiten zu untersuchen, wurde die COX gleichzeitig mit monoklonalen Antikörpern und Nukleotiden inkubiert.

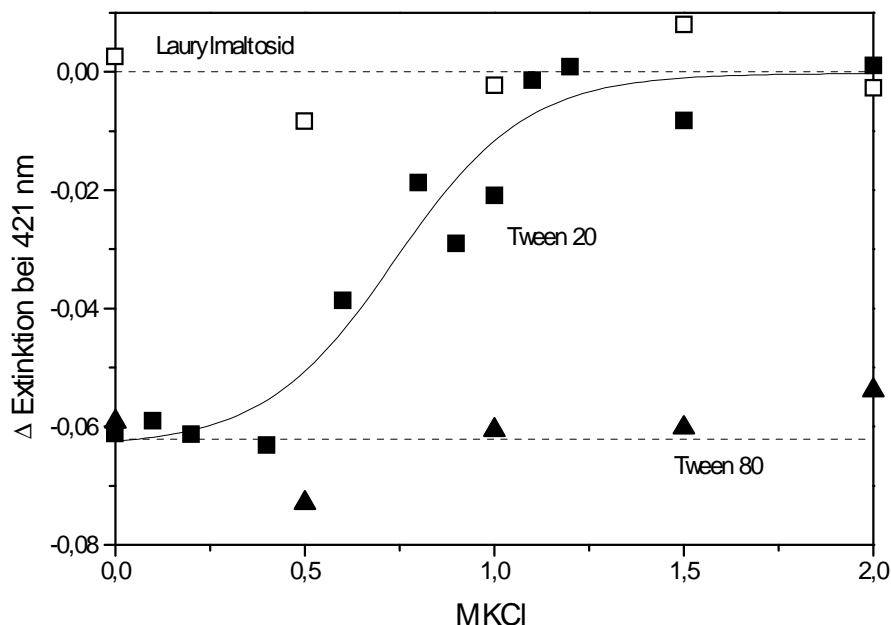
Verwendet wurde dabei ein Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc der COX (Schneyder et al., 1991), von dem bekannt war, daß er die Regulation der  $H^+/e^-$  Stöchiometrie, die beim Herzenzym in Gegenwart von ADP und ATP beobachtet werden kann, aufhebt (Frank and Kadenbach, 1996). Außerdem wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die Untereinheit IV der COX verwendet, der am löslichen Enzym Unterschiede in der Aktivität bei Anwesenheit von ADP oder ATP wieder aufhebt.

Die Daten zeigten, daß für die Änderung der  $\gamma$ -Bande wesentlich weniger ADP benötigt wurde als IDP. Die halbmaximale Änderung war bereits bei einem ADP - Anteil von 0.2 % zu beobachten, während dafür etwa 2.5 % IDP benötigt wurde. Auch durch Anwesenheit von Antikörpern gegen die Untereinheiten IV oder VIa-H, VIc der COX wird die Änderung der  $\gamma$ -Bande nicht beeinträchtigt. Wurde hingegen das Detergenz gewechselt, indem die COX statt in Tween 20 in Laurylmaltosid solubilisiert wurde, so verschwand jeder Unterschied in den spektralen Daten zwischen ATP - und ADP - inkubierter COX.

### **3.5.5 Abhängigkeit der Nukleotideffekte von der Ionenstärke**

Da die Effekte von ATP und ADP auf das Spektrum der COX von der Zusammensetzung des Puffers abhängt, wurde untersucht, wie die Veränderung der Ionenstärke in verschiedenen Detergenzien die  $\gamma$ -Bande des COX-Spektrums beeinflusste. Dazu wurde COX, die mit ATP bzw ADP inkubiert wurde, zusätzlich mit steigender Kaliumchlorid - Konzentration inkubiert, wobei neben Tween 20 und Dodecylmaltosid auch Tween 80 als Detergenz verwendet wurde (Figur 29).

Während für Laurylmaltosid bei keiner Kaliumchloridkonzentration ein Unterschied zwischen der ATP - haltigen und der ADP - haltigen Probe gemessen werden konnte, trat dieser spektrale Unterschied bei der in Tween 20 inkubierten Probe nur in Gegenwart geringer Ionenstärken auf. Ab einer KCl - Konzentration von 0.5 M war eine Verminderung des Effektes zu beobachten und oberhalb von 1.2 M KCl verschwand auch in diesem Detergenz jeglicher Unterschied in den Spektren. Lediglich bei der Verwendung von Tween 80 als Detergenz war der Unterschied der Spektren auch bei hoher Ionenstärke noch beobachtbar.

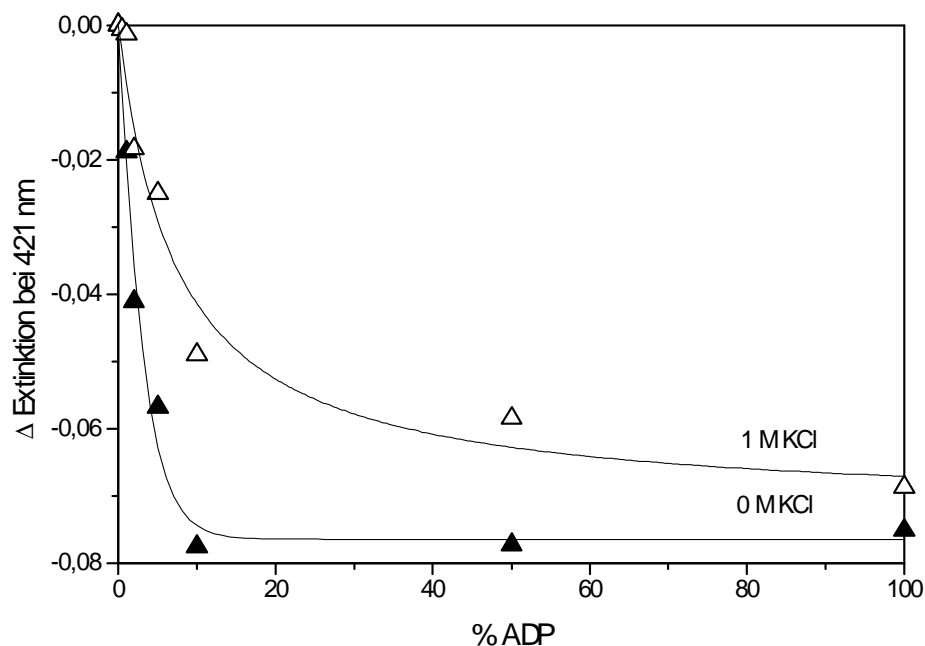


**Figur 29:** Abhängigkeit der Extinktionsänderung der  $\gamma$ -Bande des Rinderherzenzyms von der Wahl des Detergenzes und der Ionenstärke. 3  $\mu$ M COX wurde für 24 h bei 0 °C in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA sowie 1 % Tween 20 (geschlossene Quadrate) oder 1 % Tween 80 (geschlossene Dreiecke) bzw. 0.5 % Laurylmaltosid (offene Quadrate) inkubiert. Jeweils eine Probe wurde dabei mit 5 mM ATP, eine mit 5 mM ADP inkubiert. Anschließend wurde aus dem Differenzspektrum der maximale Unterschied in der  $\gamma$ -Bande ermittelt.

### 3.5.6 Untersuchung der Nukleotideffekte in Tween 80

Da Tween 80 als einziges untersuchtes Detergenz auch in Gegenwart hoher Ionenstärken eine Erniedrigung der  $\gamma$ -Bande zeigte, wurde die Wirkung von ADP in diesem Detergenz näher untersucht.

Dazu wurde analog den Untersuchungen in Tween 20 und Laurylmaltosid COX mit verschiedenen ATP/ADP - Verhältnissen inkubiert und anschließend im Photometer vermessen (Figur 30). Es wurden dabei Messungen ohne Kaliumchlorid sowie bei einer Kaliumchloridkonzentration von 1 M durchgeführt.



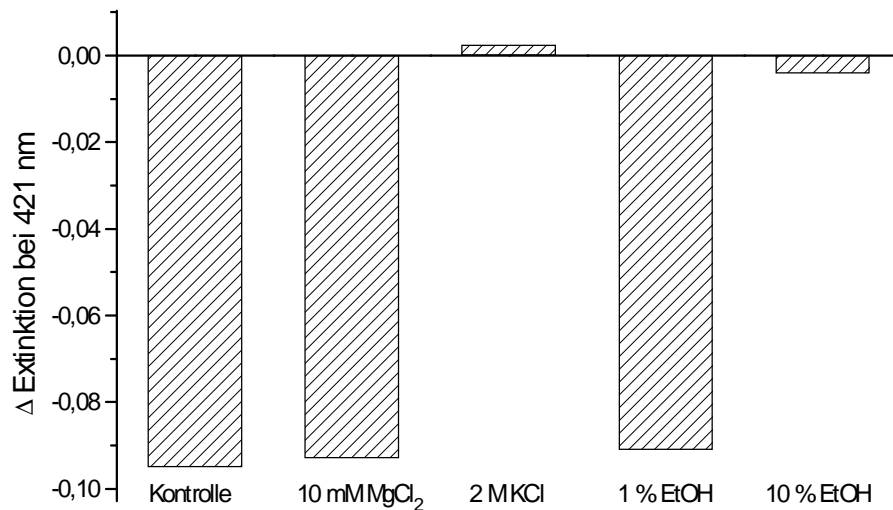
**Figur 30:** Änderung der  $\gamma$ -Bande von Rinderherz-COX in Tween 80 in Abhängigkeit vom ADP-Anteil. Proben und Referenz wurden für 24 h bei 0 °C mit 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA und 1 % Tween 80 ohne (geschlossene Dreiecke) oder mit 1 M KCl (offene Dreiecke) inkubiert und anschließend photometrisch vermessen. Die Referenz enthielt 5 mM ATP, die Proben die angegebenen ADP - Anteile bei einer Gesamtnukleotidkonzentration von 5 mM.

Es zeigte sich, daß der Unterschied zwischen 0 % und 100 % ADP fast unabhängig von der vorhandenen Ionenstärke war, jedoch war der ADP - Gehalt, bei dem der halbmaximale Effekt zu beobachten war, in Gegenwart von 1 M KCl deutlich höher (6.5 %) als in Abwesenheit von KCl (1.5 %). Es ist daher zu vermuten, daß bei genügend hoher Ionenstärke sich die Unterschiede von ADP und ATP auf das Spektrum von COX auch in Tween 80 aufheben lassen.

### 3.5.7 Wirkung anderer Effektoren auf spektrale Änderungen der $\gamma$ -Bande

Da es bei Nukleotidbindungen Hinweise darauf gibt, daß Magnesiumionen einen Einfluß auf die Bindung haben (Papa et al., 1987), wurde dies auch für die Änderungen der  $\gamma$ -Bande im COX-Spektrum untersucht. Dazu wurde Rinderherz-COX in Gegenwart von 10 mM Magnesiumchlorid mit Nukleotiden inkubiert (Figur 31).

In einem zusätzlichem Versuch wurde untersucht, ob sich die Aufhebung der spektralen Unterschiede zwischen ADP und ATP in Tween 20 außer durch hohe Ionenstärken auch durch Ethanol zeigen ließ.



**Figur 31:** Abhängigkeit der Extinktionsänderung der  $\gamma$ -Bande von der Pufferzusammensetzung. COX (3  $\mu$ M) wurde in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 % Tween 20 sowie den angegebenen Reagenzien für 24 h bei 0 °C inkubiert und vermessen. Als Referenz wurde eine mit 5 mM ATP inkubiertes Enzym, als Probe mit ADP inkubiertes Enzym vermessen. Bei der Anwesenheit von Magnesiumchlorid enthielt der Puffer kein EDTA.

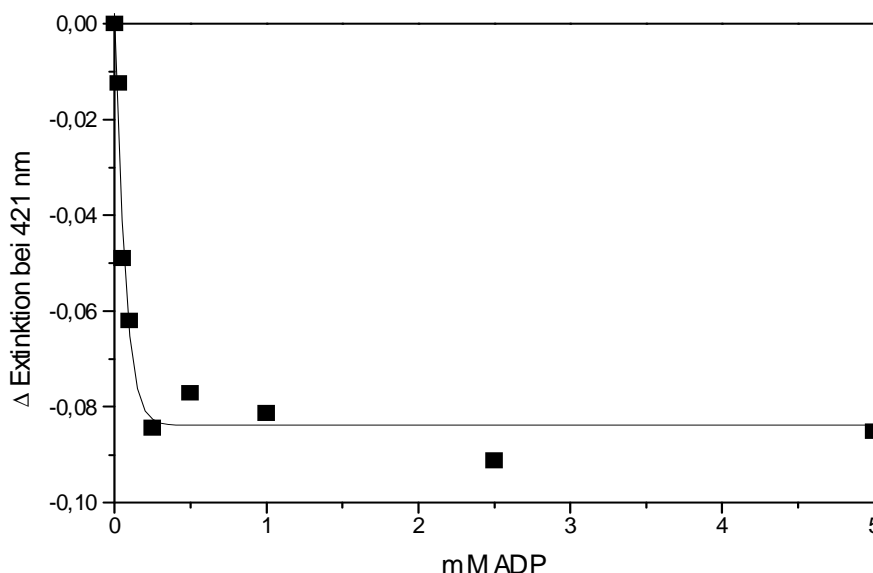
Die Messungen zeigen, daß es für die Wirkungen der Nukleotide auf das Spektrum der COX nicht von Bedeutung ist, ob EDTA oder Magnesiumchlorid anwesend ist. Die Bindung der Nukleotide erfolgt demnach nicht als Magnesiumkomplex.

Durch Zugabe von 10 % Ethanol konnte die Nukleotidwirkung ebenso aufgehoben werden, wie in Gegenwart hoher Ionenstärken, während hingegen bei einem Ethanolgehalt von 1 % keine deutliche Minderung des spektralen Effektes sichtbar war. In den Fällen, in denen die spektralen Unterschiede in Tween 20 aufgehoben waren, war jedoch am löslichen Enzym keine messbare Aktivität mehr vorhanden, so daß eine Korrelation zwischen Aufhebung der spektralen Unterschiede und der Enzymaktivität nicht möglich war.

### 3.5.8 Untersuchung der Wirkung der absoluten ADP-Konzentration

Um zu bestimmen, ob die Wirkung der Nukleotide auf die  $\gamma$ -Bande des COX-Spektrums vom ATP / ADP - Verhältnis oder von der tatsächlich vorhandenen ADP-Konzentration abhängt, wurde COX mit verschiedenen ADP-Konzentrationen inkubiert. Die Referenz enthielt 5 mM ATP, während die untersuchten Proben kein ATP enthielten, sondern nur steigende Mengen an ADP (Figur 32).

Die Messungen belegten eindeutig, daß eine Anwesenheit von ATP für die spektralen Änderungen nicht nötig war, sondern das bereits bei kleinen ADP-Konzentrationen eine Wirkung auf das Spektrum zu beobachten war. Die Konzentration bei der die halbmaximale Änderung zu beobachten war, war mit 50  $\mu$ M ADP höher als der Wert, der sich aus Figur 28 in Gegenwart von ATP ergab. Bei diesen Messungen hatte ein ADP-Anteil von 0.2 % bereits für eine halbmaximale Änderung ausgereicht. Dies entsprach einer ADP-Konzentration von 10  $\mu$ M. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, daß bei der Abwesenheit von ATP alle Bindungsstellen nur von ADP besetzt werden konnten, während bei einem Gemisch aus ADP und ATP viele der Bindungsstellen aufgrund des Überschusses durch ATP besetzt waren, so daß die freie ADP-Konzentration bei gleicher eingesetzter ADP-Menge in Gegenwart von ATP höher war.



**Figur 32:** Änderung der Extinktion von COX aus Rinderherz bei 421nm nach Inkubation mit Nukleotiden für 24 h. Als Referenz wurde mit 5 mM ATP inkubierte COX genommen. Die Proben enthielten die angegebenen Konzentrationen ADP. Der Inkubationspuffer enthielt 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1mM EDTA und 1 % Tween 20.

Zum direkten Vergleich der Werte in An- und Abwesenheit von ATP muß man die freie Konzentration an ADP kennen. Dies läßt sich für den Versuch in Abwesenheit von ATP abschätzen. Mit den ADP-Bindungsstudien mittels Gleichgewichtsdialyse wurde eine mittlere  $K_d$  für die Bindung von ADP an COX von 28.5  $\mu\text{M}$  ermittelt. Die Bindung von ADP kann als Gleichgewichtsreaktion betrachtet werden, so daß sich ein Massenwirkungsgesetz aufstellen läßt:

Für die Reaktion  $10 \text{ ADP} + \text{COX} \rightleftharpoons [\text{COXADP}_{10}]$   
folgt für die Dissoziationskonstante

$$K_d = \frac{[\text{COXADP}_{10}]}{[\text{ADP}]^{10} * [\text{COX}]} : [\text{ADP}] = \text{freie ADP-Konzentration}$$

wobei unter den gewählten Versuchsbedingungen für die halbmaximale spektrale Änderung gilt :

$$\begin{aligned} [\text{ADP}_{\text{Gesamt}}] &= [\text{ADP}] + 10 * [\text{COXADP}_{10}] = 50 \mu\text{M} \\ [\text{COX}_{\text{Gesamt}}] &= [\text{COXADP}_{10}] + [\text{COX}] = 3 \mu\text{M} \\ [\text{COX}] &= [\text{COX}_{\text{Gesamt}}] - [\text{COXADP}_{10}] = 3 - [\text{COXADP}_{10}] \\ [\text{COXADP}_{10}] &= 5 - [\text{ADP}] / 10 \\ [\text{COX}] &= 3 - (5 - [\text{ADP}] / 10) \\ K_d &= 28.5 \mu\text{M} \quad (\text{siehe Tabelle 4}) \end{aligned}$$

eingesetzt ergibt sich für das Massenwirkungsgesetz:

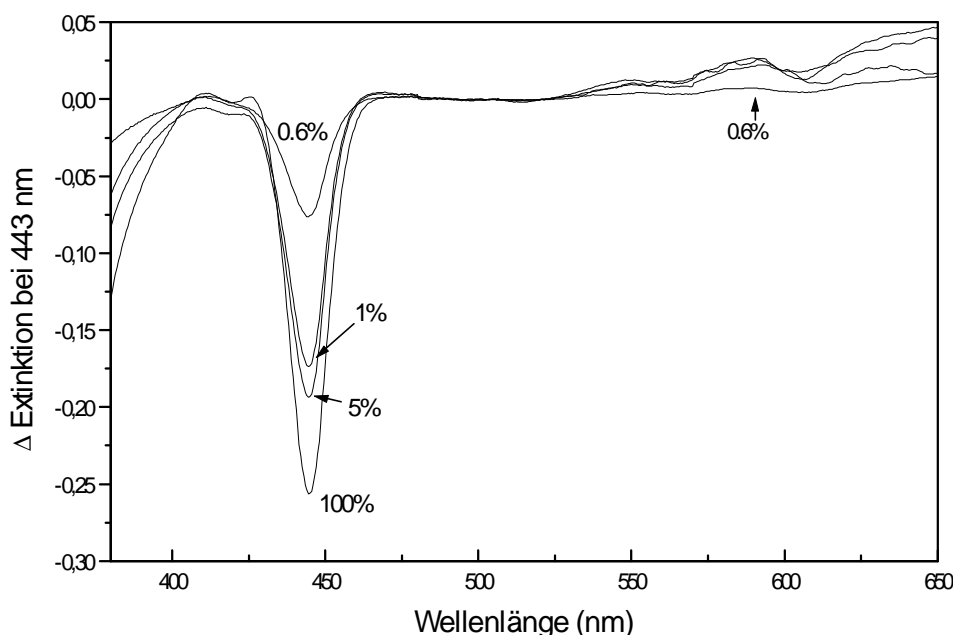
$$28.5 = \frac{5 - [\text{ADP}] / 10}{[\text{ADP}]^{10} * (3 - (5 - [\text{ADP}] / 10))}$$

$$\Rightarrow 8.55 * [\text{ADP}]^{11} - 57 * [\text{ADP}]^{10} + [\text{ADP}]/10 - 5 = 0$$

Dies läßt sich mathematisch nicht lösen, sondern nur noch grafisch. Dabei ergibt sich, daß obige Gleichung für eine freie ADP - Konzentration von 6.67  $\mu\text{M}$  näherungsweise Null wird. Dies dürfte ungefähr der freien ADP-Konzentration entsprechen, die sich bei einem ADP-Anteil von 0.2 % in 5 mM Gesamtnukleotid ergibt.

### 3.5.9 Nukleotideffekte am reduzierten Enzym

Die bisher gezeigten Experimente wurden ausnahmslos am oxidierten Enzym durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die Wirkung des ADP auf das oxidierte Enzym beschränkt war oder ob auch eine Wirkung auf das Spektrum des reduzierten Enzyms beobachtet werden konnte, wurden Messungen in Gegenwart von Natriumdithionit durchgeführt (Figur 33).

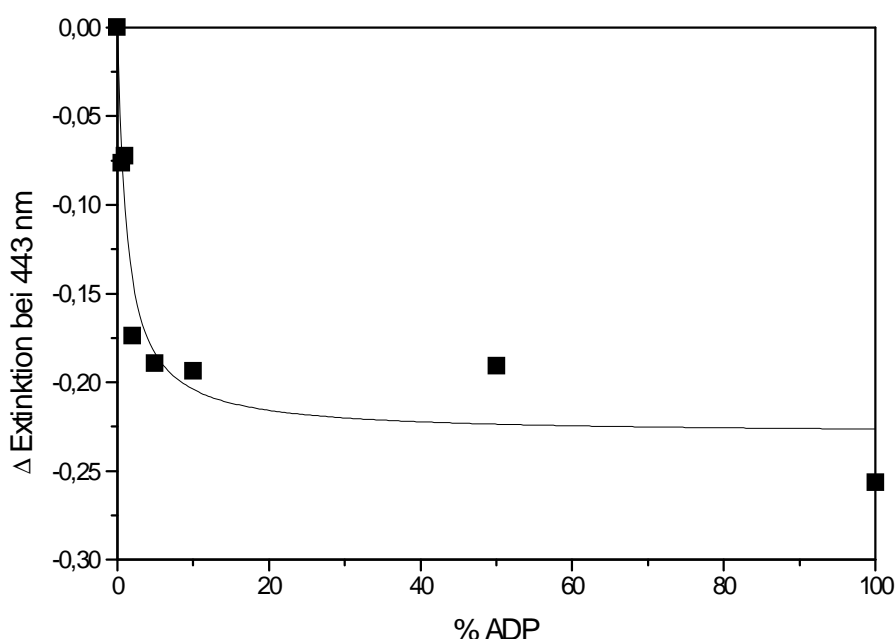


**Figur 33:** Spektrale Änderungen reduzierter COX aus Rinderherz in Gegenwart von ADP und ATP. Die Differenzspektren (Extinktion) wurden mit 100 % ATP (5 mM) in der Referenzküvette gemessen, während sich in der Probenküvette die angezeigten ADP - Anteile befanden. Die Gesamtkonzentration an Nukleotiden betrug immer 5 mM. Vor der Messung wurden 3  $\mu$ M COX mit den Nukleotiden in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA und 1% Tween 20 für 24 h bei 0 °C inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben mit 2 mM Natriumdithionit versetzt, um das Enzym zu reduzieren.

Auch beim reduzierten Enzym war eine Wirkung der Nukleotide auf das Spektrum zu beobachten. Jedoch ist der Einfluß auf die  $\gamma$ -Bande deutlich geringer. Wurde die  $\gamma$ -Bande beim oxidierten Enzym in der Gegenwart von ADP um 12 % reduziert, so betrug die maximale Erniedrigung bei der reduzierten COX nur etwa 3 %. Die Verschiebung der  $\alpha$ -Bande wurde jedoch durch die Reduktion des Enzyms nicht beeinträchtigt.

Um die Abhängigkeit der Wirkung der Adennukleotide auf das Spektrum näher zu untersuchen, wurden ähnlich den Messungen beim oxidierten Enzym,

Untersuchungen bei verschiedenen ADP/ATP - Verhältnissen durchgeführt (Figur 34).



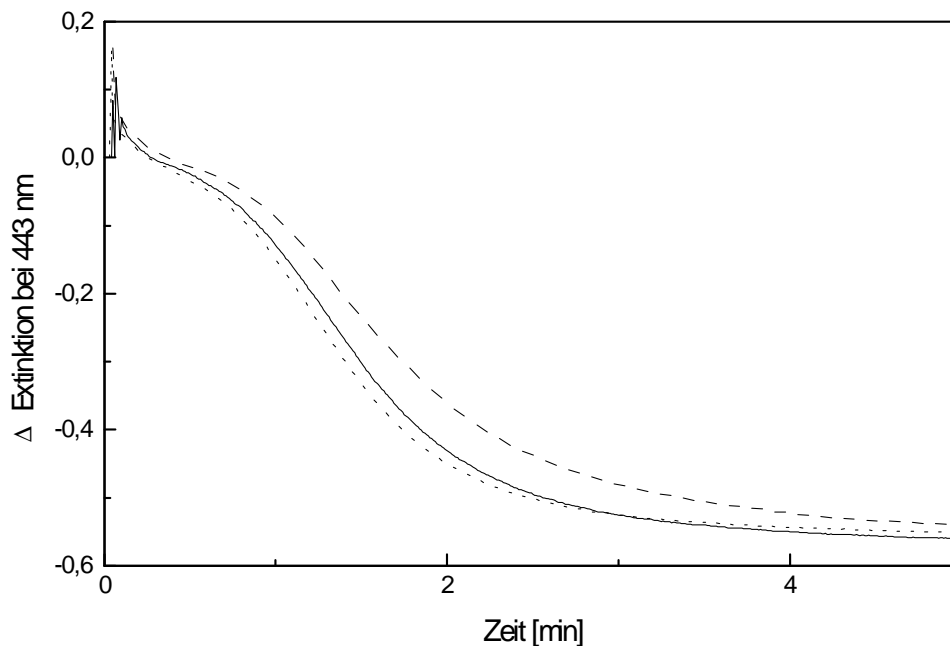
**Figur 34:** Änderung der Extinktion bei 443 nm der reduzierten COX nach Inkubation mit verschiedenen ATP/ADP-Verhältnissen für 24 h bei 0°C. Als Referenz wurde mit 5 mM ATP inkubierte COX genommen. Die Proben enthielten die angegebenen Prozentgehalte ADP bei einer totalen Nukleotidkonzentration von 5 mM. Der Inkubationspuffer enthielt 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 1mM EDTA. und 1 % Tween 20. Unmittelbar vor der photometrischen Messung wurde eine Natriumdithionit-Konzentration von 2 mM eingestellt.

Ähnlich wie bei der Messung des oxidierten Rinderherzenzyms (Figur 28) reichten bereits geringe ADP-Anteile, um die  $\gamma$ -Bande des Spektrums zu reduzieren. Die Konzentration, bei der die halbmaximale Änderung der  $\gamma$ -Bande beobachtet werden konnte, lag jedoch nicht wie beim oxidierten Enzym bei 0,2 % oder 10  $\mu$ M, sondern bei 1 % oder 50  $\mu$ M.

Aus diesen Messungen ergab sich, daß die Wirkung von ADP auf das Spektrum vom Oxidationsgrad des Enzyms abhing. Außerdem schien der Oxidationsgrad auch die Affinität dieser Bindungsstelle zu beeinflussen.

Da ADP sowohl die  $\gamma$ -Bande der oxidierten als auch der reduzierten COX beeinflusste, wurde die Dauer der Selbstoxidation von COX in Gegenwart von Nukleotiden untersucht. Dazu wurde mit Nukleotiden inkubiertes Enzym mit 50  $\mu$ M Natriumdithionit reduziert. Die anschließende Oxidation durch Sauerstoff wurde als Erniedrigung der Extinktion bei 443 nm gemessen (Figur 35).





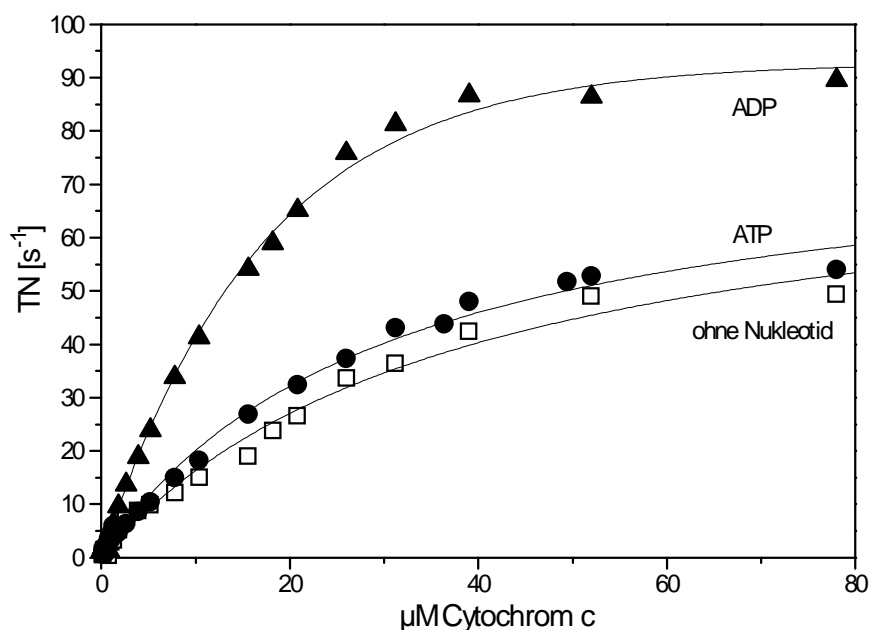
**Figur 35:** Zeitabhängigkeit der Selbstoxidation von Rinderherz-COX durch Luftsauerstoff in Gegenwart von Nukleotiden. 3  $\mu\text{M}$  COX wurde in 50 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA und 1 % Tween 20 für 24 h mit 5 mM ATP (gepunktete Linie), 5 mM ADP (unterbrochene Linie) oder ohne Nukleotide (durchgezogene Linie) bei 0 °C inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurde zur Probe 50  $\mu\text{M}$  Natriumdithionit gegeben. Die durch die Zugabe von Natriumdithionit entstandenen, unspezifischen Peaks wurden in der Grafik entfernt. Die maximal bei 443 nm erreichte Extinktion wurde als Referenzwert benutzt und 0 gesetzt.

Der zeitliche Verlauf der Selbstoxidation in Gegenwart von ATP und ohne Nukleotide war weitestgehend identisch, so betrug  $t_{1/2}$  für die Oxidation für das ATP - inkubierte Enzym 81 s und für das unbehandelte Enzym 85 s. In Gegenwart von ADP verlängert sich jedoch der Oxidationsprozeß und damit  $t_{1/2}$  auf 100 s.

### 3.6 Wirkung von Nukleotiden auf die Aktivität des löslichen Enzyms

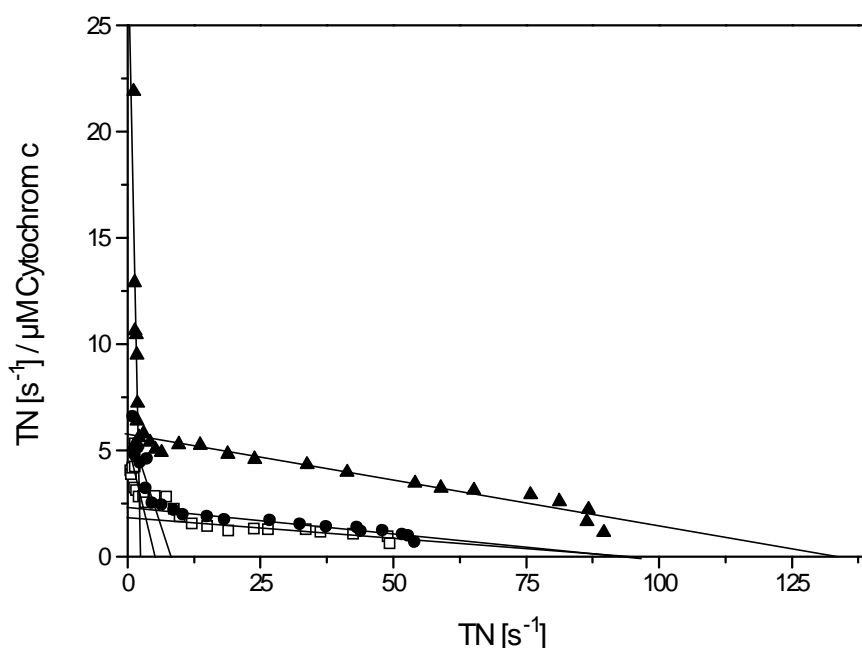
#### 3.6.1 Abhängigkeit vom Detergenz

Für Keilin-Hartree-Partikel wurde bereits 1976 (Ferguson-Miller et al., 1976) gezeigt, daß die Gegenwart von Nukleotiden die Aktivität des Enzyms beeinflusst. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß die Aktivität der COX in Gegenwart von ATP einer Hemmung unterliegt. Um zu untersuchen, ob sich auch eine Wirkung auf das solubilisierte Enzym nachweisen ließe, wurde isolierte Rinderherz-COX, die in einem Tween 20 haltigem Puffer gelöst wurde, mit ATP und ADP inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Aktivität des Enzyms polarografisch (siehe 2.15) gemessen (Figur 36).



**Figur 36:** Aktivität löslicher Rinderherz-COX in Gegenwart von ATP, ADP oder ohne Nukleotid. 0.1  $\mu\text{M}$  COX wurde in 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 % Tween 20 mit 5 mM ATP (geschlossene Kreise), 5 mM ADP (geschlossene Dreiecke) oder ohne Nukleotid (offene Quadrate) für 24 h bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität mit steigender Cytochrom c Konzentration gemessen.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen war eine deutlich höhere Aktivität der Cytochrom c Oxidase zu beobachten, wenn das Enzym mit ADP vorinkubiert wurde. Zur genaueren Bestimmung der  $K_M$  und  $v_{Max}$  Werte wurden die Daten in einem inversen Eadie - Hofstee - Plot aufgetragen (Figur 37).



**Figur 37:** Eadie - Hofstee -Plot für die Aktivität in Tween 20 gelöster COX in Gegenwart von ATP (geschlossene Kreise), ADP (geschlossene Dreiecke) oder ohne Nukleotid (offene Quadrate). Die Daten wurden der Figur 36 entnommen.

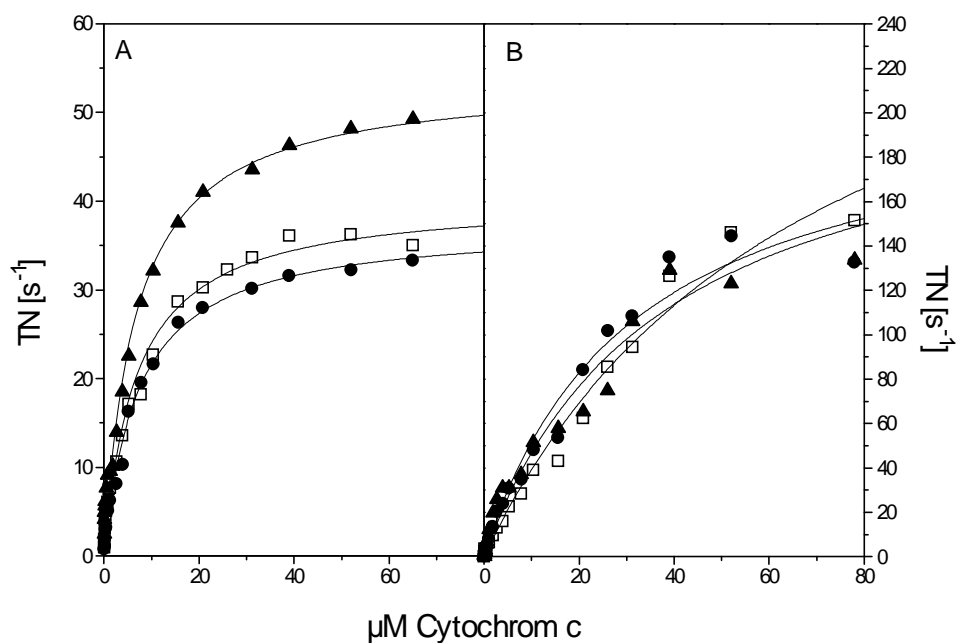
Durch den Eadie - Hofstee - Plot wurde gezeigt, daß die Aktivität des löslichen Enzyms in Gegenwart von ATP sich kaum von der ohne Nukleotide unterscheidet. Sowohl die Affinitäten als auch Maximalgeschwindigkeiten der COX in den beiden Proben ist nahezu identisch. In Gegenwart von ADP wurden jedoch andere Werte für  $v_{Max}$  und  $K_M$  bestimmt (Tabelle 7).

In Gegenwart von ADP war sowohl  $K_{M1}$  als auch  $K_{M2}$  erniedrigt, was bedeutet, daß die Affinität der COX für Cytochrom c zugenommen hat. Während  $v_{Max1}$  leicht erniedrigt war, wurde für  $v_{Max2}$  ein erhöhter Wert bestimmt. Bestimmt man das Verhältnis von  $k_{cat}$  ( $= v_{Max}$ ) und  $K_M$ , so macht dieser Quotient eine Aussage über katalytische Effizienz des untersuchten Enzyms. Dieser Wert war sowohl für die hochaffine als auch für die niedrigaffine Bindungsstelle der COX erhöht, so daß eindeutig bewiesen wurde, daß die Aktivität der solubilisierten COX in Gegenwart von ADP gegenüber ATP-inkubierter COX erhöht war.

**Tabelle 7:** Einfluß von ATP und ADP auf die katalytische Effektivität der isolierten, in Tween 20 solubilisierten Cytochrom c Oxidase. Die Daten wurden der Figur 37 entnommen.

	Kontrolle	ATP	ADP
$v_{\text{Max}1} [\text{s}^{-1}]$	6.0	7.8	2.4
$v_{\text{Max}2} [\text{s}^{-1}]$	92	94	133
$K_{\text{M}1} [\mu\text{M}]$	1.1	1.1	0.07
$K_{\text{M}2} [\mu\text{M}]$	50	41	23
$k_{\text{cat}1} / K_{\text{M}1} [\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	5.5	7.1	34.2
$k_{\text{cat}2} / K_{\text{M}2} [\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	1.8	2.3	5.8

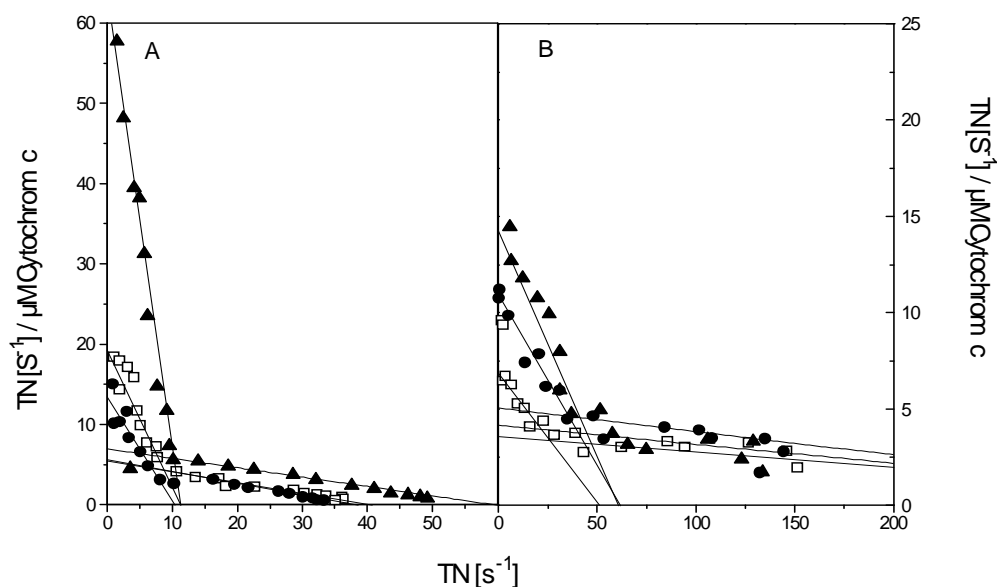
Da sich bereits bei der Untersuchung der spektralen Effekte von Nukleotiden auf die COX gezeigt hatte, daß die Wirkung von Nukleotiden abhängig war von dem Detergenz, in dem das Enzym solubilisiert wurde, wurden ebenso Messungen der Enzymaktivität in Tween 80 und Laurylmaltosid durchgeführt (Figur 38).



**Figur 38:** Aktivität von löslicher COX aus Rinderherz in Anwesenheit von ATP, ADP oder ohne Nukleotid. 0.1  $\mu\text{M}$  COX wurden in 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 % Tween 80 (A) oder 0.5 % Laurylmaltosid (B) mit 5 mM ATP (geschlossene Kreise), 5 mM ADP (geschlossene Dreiecke) oder ohne Nukleotid (offene Quadrate) für 24 h bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität mit steigender Cytochrom c Konzentration gemessen.

Die in Tween 80 solubilisierte COX verhielt sich ähnlich wie die COX, die in Tween 20 gelöst war. Auch hier wurde das Enzym durch ADP stimuliert, wenn auch in geringerem Umfang, während sich die nukleotidfreie COX sowie die ATP-inkubierte COX nahezu identisch verhielten. Insgesamt war jedoch die Aktivität in Tween 80 gegenüber der in Tween 20 erniedrigt. In Laurylmaltosid solubilisierte COX zeigte keinerlei Unterschiede der Aktivität in Abhängigkeit der Gegenwart von ADP oder ATP. In allen drei gemessenen Ansätzen war die Aktivität deutlich höher als die Enzymaktivität in Gegenwart von Tween 20 oder Tween 80. Es war jedoch keine Stimulierung durch ADP beobachtbar.

Zur genaueren Auswertung der einzelnen Messungen und zur Bestimmung von  $v_{\text{Max}}$  und  $K_{\text{M}}$  wurden die Daten in einem Eadie - Hofstee - Plot aufgetragen (Figur 39).



**Figur 39:** Eadie - Hofstee - Plot für die Aktivität von COX in Tween 80 (A) oder Laurylmaltosid (B) gelöster COX in Gegenwart von ATP (geschlossene Kreise), ADP (geschlossene Dreiecke) oder ohne Nukleotid (offene Quadrate). Die Daten wurden der Figur 38 entnommen.

Durch den Eadie - Hofstee - Plot wurde bestätigt, daß die Aktivität des in Tween 80 gelösten Enzyms in Gegenwart von ATP sich kaum von der ohne Nukleotide unterschied. Sowohl die Affinitäten als auch die Maximalgeschwindigkeiten der COX in den beiden Proben waren nahezu identisch. In Gegenwart von ADP wurden jedoch andere Werte für  $v_{\text{Max}}$  und  $K_{\text{M}}$  bestimmt (Tabelle 8). Für das in Laurylmaltosid solubilisierte Enzym hat der Eadie - Hofstee - Plot, die bereits nach Figur 38 erwartete, Unabhängigkeit der Aktivität von vorhandenen Nukleotiden bestätigt.

**Tabelle 8:** Einfluß von ATP und ADP auf die katalytische Effektivität der isolierten, in Tween 80 oder Laurylmaltosid solubilisierten Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz. Die Daten wurden der Figur 39 entnommen.  $k_{\text{eff}}$  ist der Quotient aus  $v_{\text{Max}}$  und  $K_M$  und dient als Maß für die katalytische Effizienz.

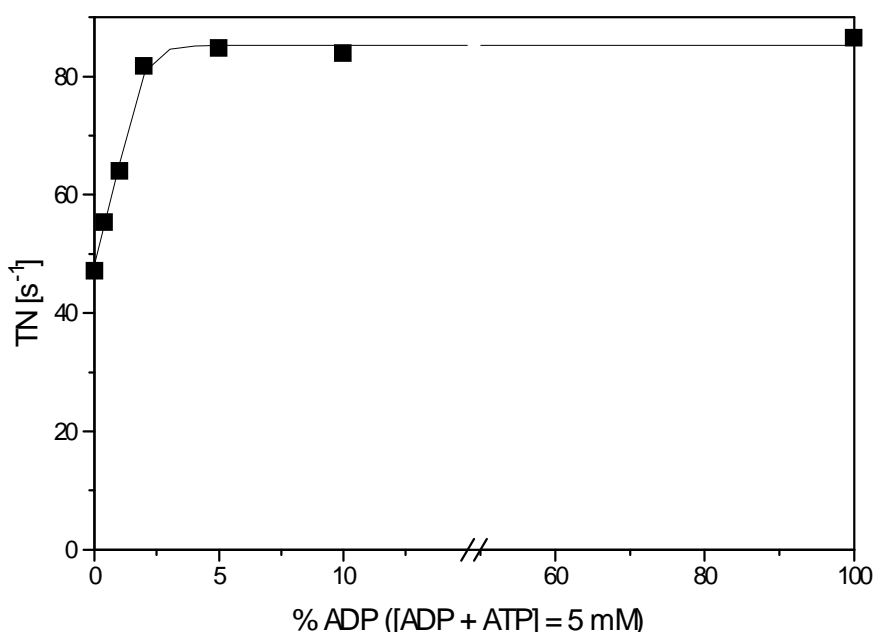
	Tween 80			Laurylmaltosid		
	Kontrolle	ATP	ADP	Kontrolle	ATP	ADP
$v_{\text{Max}1} [\text{s}^{-1}]$	11,15	10,5	11,35	51,45	62,91	60,3
$v_{\text{Max}2} [\text{s}^{-1}]$	41,47	38,35	59,16	419,1	412,9	401,2
$K_{M1} [\mu\text{M}]$	0,68	0,78	0,18	7,01	5,84	3,93
$K_{M2} [\mu\text{M}]$	7,33	6,97	8,56	101,4	81,97	88,11
$k_{\text{eff}1} [\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	16,39	13,46	63,06	7,34	10,77	15,34
$k_{\text{eff}2} [\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	5,66	5,50	6,91	4,13	5,04	4,55

Auffallend war, daß die katalytische Effizienz der hochaffinen Bindungsstelle für Cytochrom c sowohl bei Verwendung von Tween 20 als auch bei Tween 80 stärker durch die Anwesenheit von ADP beeinflußt wird, als die niedrigaffine. Selbst bei Anwesenheit von Laurylmaltosid war ein kleiner Effekt von ADP beobachtbar.

### 3.6.2 Einfluß des Nukleotidverhältnisses auf die Aktivität der COX

Da bereits gezeigt werden konnte, daß die meisten der Nukleotidbindungsstellen an der COX sowohl ATP als auch ADP binden, wurde untersucht, wie sich die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit vom Nukleotidverhältnis ändert. Dazu wurde das Enzym mit verschiedenen Nukleotidverhältnissen für 24 h vorinkubiert, wobei die Gesamtkonzentration an Nukleotiden konstant 5 mM betrug. Anschließend wurde die Aktivität bei konstanter Cytochrom c Konzentration gemessen (Figur 40).

Die Messungen ergaben, daß bereits geringe Anteile an ADP zu einer Stimulierung der Atmung ausreichen. Bereits 1 % ADP reichen aus, um die halbmaximale Stimulierung zu erreichen.



**Figur 40:** Abhängigkeit der Aktivität in Tween 20 gelöster COX vom ATP/ADP-Verhältnis. 0.1  $\mu\text{M}$  COX aus Rinderherz wurde in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA und 1 % Tween 20 gelöst und mit den angegebenen Anteilen ADP sowie ATP bei einer Gesamtnukleotidkonzentration von 5 mM für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität bei einer Cytochrom c Konzentration von 39  $\mu\text{M}$  gemessen.

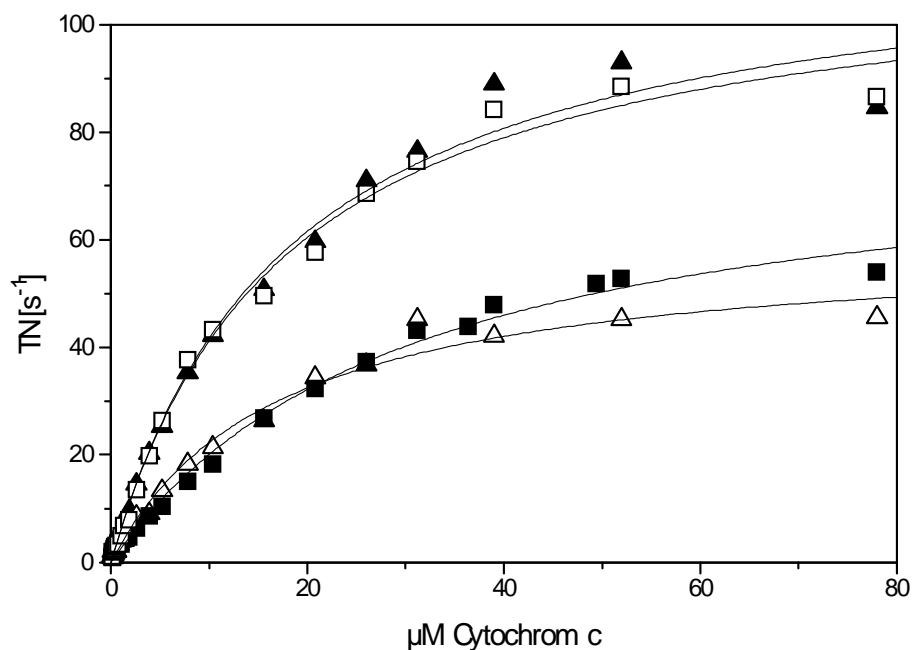
### 3.6.3 Einfluß der Inkubationszeit auf die Stimulierung der Aktivität

In allen bisherigen Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß die Wirkung von Nukleotiden auf die isolierte COX abhängig von der Inkubationszeit war (Figur 13, Figur 16 und Figur 26). Daher sollten zwei Aspekte der Zeitabhängigkeit auch an der Aktivität löslicher COX untersucht werden. Zum einen wurde untersucht, ob es für die Wirkung der Nukleotide auf die Aktivität des Enzyms eine Zeitabhängigkeit gibt, zum anderen, ob diese Zeitabhängigkeit ein generelles Phänomen des Enzyms ist oder ob dies durch die Isolationsmethode ausgelöst wurde.

Um die Frage nach dem Vorhandensein einer Zeitabhängigkeit zu lösen, wurde die Aktivität von COX unmittelbar nach der Inkubation mit ADP ebenso wie nach einer Inkubationszeit von 24 h bestimmt (Figur 41).

Es zeigte sich deutlich, daß das unmittelbar nach der Zugabe von ADP untersuchte Enzym eine niedrigere Aktivität aufwies. Die Aktivität entsprach in etwa der, die COX aufwies, die 24 h mit ATP inkubiert wurde.

Um zu zeigen, ob die lange Inkubationszeit immer benötigt wurde oder nur durch die Isolierung bedingt war, wurde COX für 24 h mit ATP inkubiert, ein Teil dieser Probe wurde direkt vermessen, dem anderen Teil wurde zusätzlich ADP hinzugefügt. Unmittelbar nach der Zugabe von ADP wurde die Aktivität dieser Probe bestimmt (Figur 41). Es zeigte sich, daß in diesem Fall eine sofortige Stimulierung der COX durch ADP zu beobachten war. Da die Zeitabhängigkeit der Bindungsstelle (oder Bindungsstellen), die für die Stimulierung der COX durch Zugabe von ADP zuständig ist, durch die Vorinkubation mit ATP verkürzt wird, sollte diese Bindungsstelle beide Nukleotide, ATP und ADP, binden.



**Figur 41:** Aktivität löslicher COX in Abhängigkeit der Inkubationszeit. 0.1  $\mu\text{M}$  Rinderherz-COX wurde in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA und 1 % Tween 20 bei 0 °C mit 5 mM Nukleotiden vorinkubiert. Geschlossene Quadrate: 24 h Vorinkubation mit ATP; geschlossene Dreiecke: 24 h Vorinkubation mit ADP; offene Dreiecke: direkte Messung nach Zugabe von ADP; offene Quadrate: 24 h Vorinkubation mit ATP, Zugabe von 5 mM ADP unmittelbar vor der Messung.

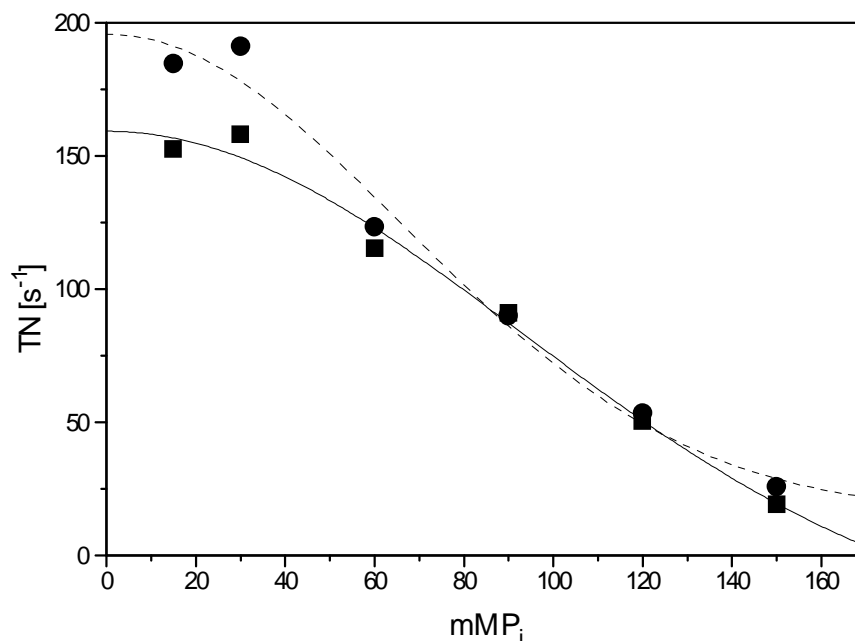
### 3.6.4 Abhängigkeit der Aktivität der COX von der Pufferzusammensetzung

Zur Überprüfung des Einflusses der Pufferzusammensetzung auf die Aktivität der COX wurde die Aktivität in verschiedenen Puffersystemen gemessen.



Zuerst wurde untersucht, ob die Aktivität des Enzyms von der Ionenstärke des Puffers abhängt. Dabei wurde COX in verschiedenen Kaliumphosphatpuffern, die Laurylmaltosid als Detergenz enthielten, vermessen (Figur 42).

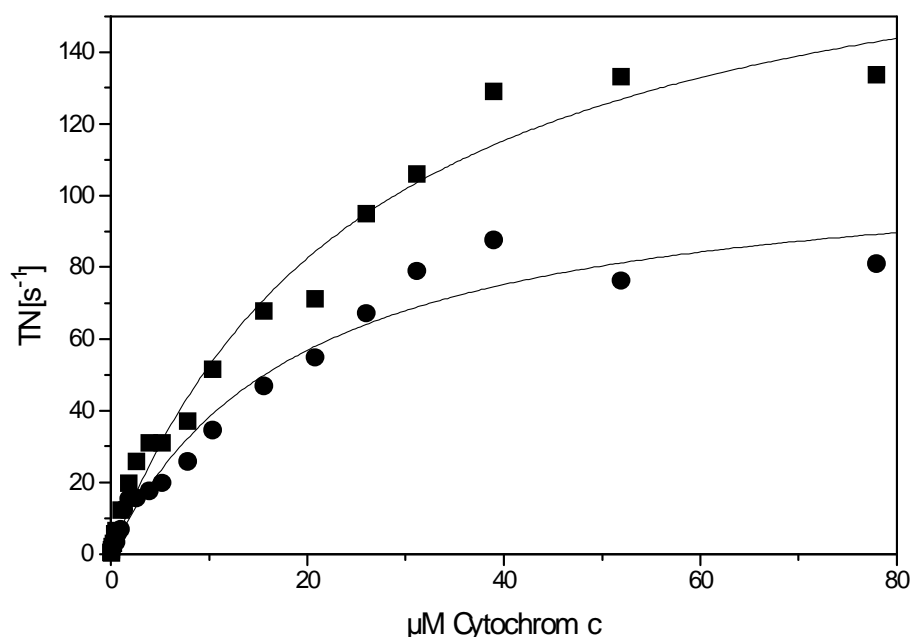
Die Aktivität solubilisierter COX wurde in der Literatur am häufigsten in Laurylmaltosid gemessen, da die Atmungsraten der COX dann am ehesten den physiologischen Atmungsraten entspricht (Thompson et al., 1982). Deshalb wurde Laurylmaltosid für diese Messungen als Detergenz benutzt.



**Figur 42:** Einfluß des Phosphatgehalts auf die Aktivität löslicher COX in 0.5 % Laurylmaltosid. Die Aktivität von 0.1 µM COX wurde in verschiedenen Puffern mit einer Kaliumphosphatkonzentration von 15 mM bis 150 mM (pH 7.4) bei einer Cytochrom c Konzentration von 12 µM (Quadrate) und 21 µM (Kreise) gemessen.

Der Versuch zeigte, daß die Aktivität von der Ionenstärke abhängig war und bei hohen Phosphatkonzentrationen stark abnahm. Dies war auch der Grund, warum die Abnahme der Wirkung von ADP in Tween 20 bei hohen Ionenstärken nicht mit Aktivitätsmessungen korreliert werden konnte, da bei den benötigten Kaliumchloridkonzentrationen von 500 mM und mehr keinerlei Aktivität mehr messbar war.

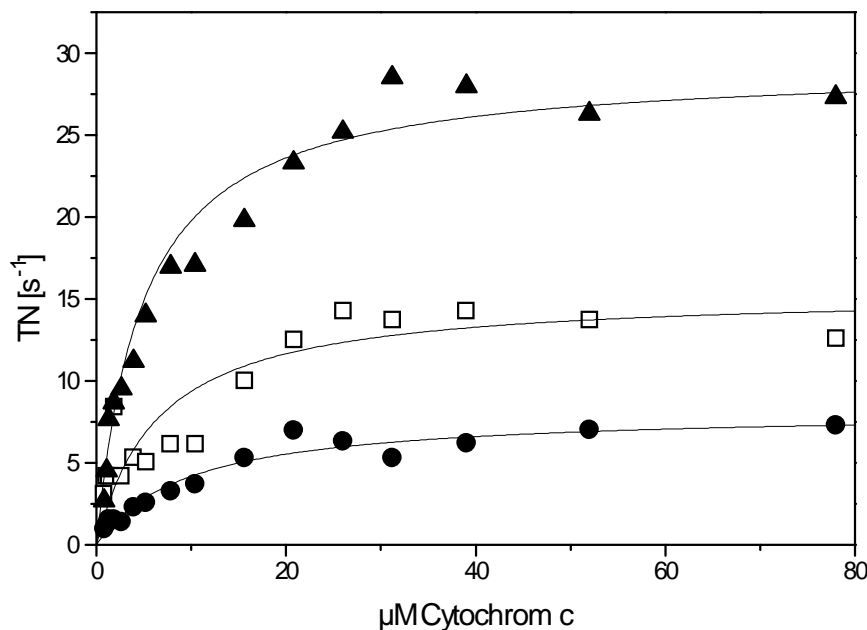
Als zweites wurde untersucht, ob die puffernde Substanz einen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms zeigte. Dazu wurde die Aktivität des in Laurylmaltosid gelösten Enzyms in einem Kalium-Hepes-haltigen Puffer gemessen und mit der Aktivität in einem Kaliumphosphat-haltigem Puffer verglichen (Figur 43).



**Figur 43:** Abhängigkeit der Enzymaktivität von der puffernden Substanz. 0.1  $\mu\text{M}$  COX wurde in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4 (Quadrate) oder 50 mM Kalium-HEPES, pH 7.4 (Kreise) jeweils mit 1 mM EDTA und 0.5 % Laurylmaltosid gelöst. Anschließend wurde die enzymatische Aktivität polarografisch bestimmt.

Es zeigte sich, daß auch die puffernde Substanz Einfluß auf die gemessene Aktivität des Enzyms hatte.

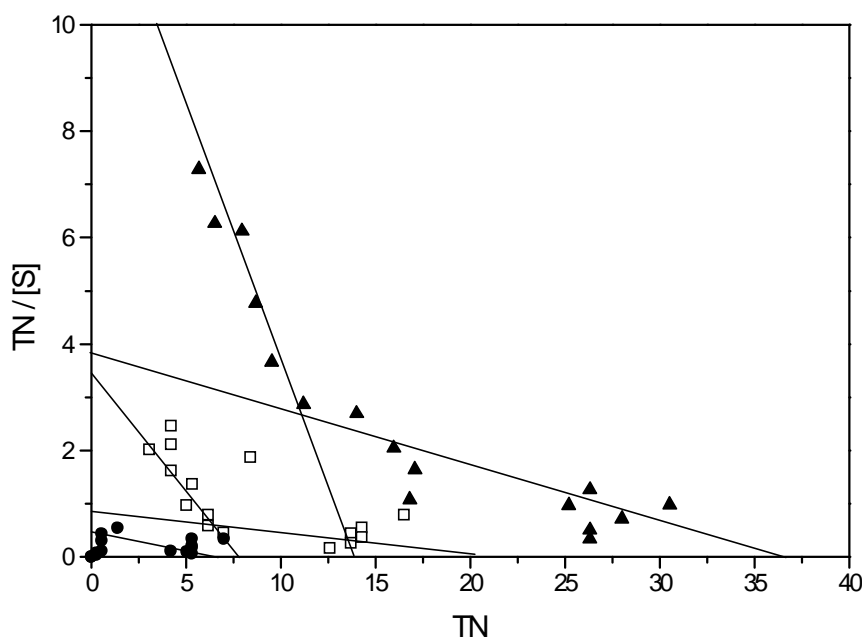
Als drittes sollte die Wirkung von vorhandenen Magnesiumionen auf die Aktivität der COX untersucht werden. Dazu enthielt der Inkubationspuffer anstelle des EDTA 10 mM Magnesiumchlorid (Figur 44). Um die Frage zu klären, ob die Ausbildung eines Magnesium-Nukleotidkomplexes die Wirkung der Nukleotide auf die Aktivität beeinflußt, wurden die Versuche nicht in Laurylmaltosid, sondern in Tween 80 durchgeführt.



**Figur 44:** Aktivität löslicher COX in Gegenwart von Magnesiumchlorid. Das Enzym (0.1  $\mu\text{M}$ ) wurde für 24 h bei 0 °C in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 10 mM Magnesiumchlorid und 1 % Tween 80 mit 5 mM ATP (geschlossene Kreise), 5 mM ADP (geschlossene Dreiecke) oder ohne Nukleotid (offene Quadrate) inkubiert.

Durch die Anwesenheit von Magnesiumchlorid wurde die Aktivität aller drei Proben erniedrigt und zwar stärker als durch die Erhöhung der Ionenstärke erklärbar wäre. Deutlich sichtbar blieb jedoch die Stimulierung der Atmungsrate in Gegenwart von ADP. Entgegen den Messungen in Abwesenheit von Magnesiumchlorid war in diesem Versuch die Aktivität der ATP-inkubierten COX sogar niedriger als die der Probe, die ohne Nukleotide inkubiert wurde. Zur genaueren Bestimmung der  $K_M$ - und  $v_{\text{Max}}$ -Werte wurden die Daten in einem Eadie - Hofstee - Plot aufgetragen (Figur 45).

Der Plot bestätigte die Unterschiede in den Werten vor allem zwischen ADP- und ATP- inkubierter COX. Das Fehlen der Zweiphasigkeit des Plots für die ATP-haltige COX war weniger auf ein Nichtvorhandensein zurückzuführen, als vielmehr darauf, daß die Daten aufgrund der niedrigen Atmungsraten eine genauere Auswertung nicht zuließen. Die Versuche in Gegenwart von Magnesiumchlorid zeigten, daß nicht nur ADP die Atmungsrate der COX beeinflusst, sondern auch die Anwesenheit von ATP. Dies bestätigt, daß die Bindungsstelle(n) die für diesen Effekt verantwortlich ist, beide Nukleotide binden kann.



**Figur 45:** Eadie - Hofstee - Plot für die Aktivität löslicher COX in Gegenwart von Magnesiumchlorid nach Inkubation mit ATP (geschlossene Kreise), ADP (geschlossene Dreiecke) oder ohne Nukleotid (offene Quadrate). Die Daten wurden der Figur 44 entnommen.

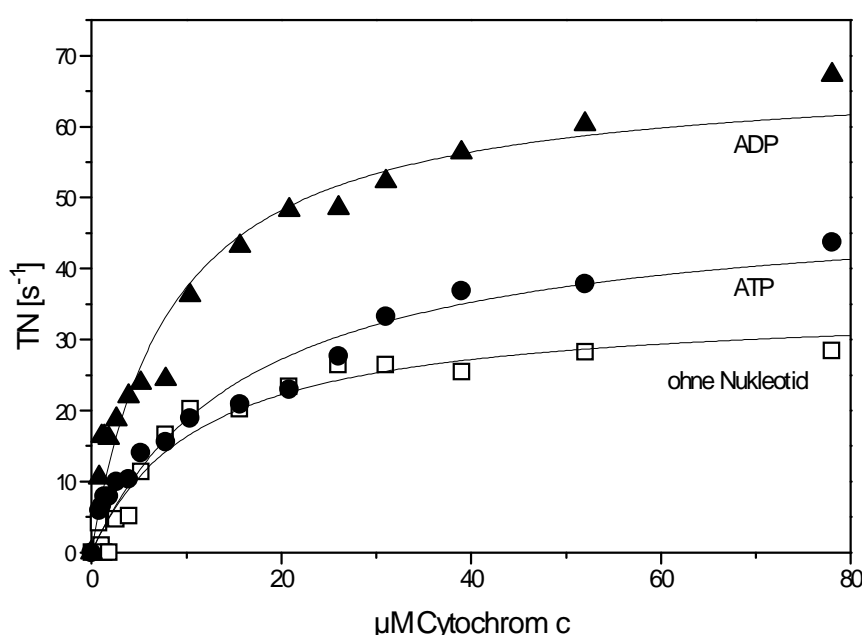
Die ermittelten Werte zeigten, daß die katalytische Effizienz in Gegenwart von Magnesiumchlorid vermindert war. Jedoch trat diese Verminderung unabhängig von der Anwesenheit eines bestimmten Adennukleotids auf, so daß man daraus schließen kann, daß Magnesiumionen die Wirkung von ADP oder ATP nicht beeinflussen.

**Tabelle 9:** Einfluß von Magnesiumchlorid auf  $K_M$  und  $v_{Max}$ . Die Daten wurden der Figur 45 entnommen.  $k_{eff}$  ist der Quotient aus  $v_{Max}$  und  $K_M$  und dient als Maß für die katalytische Effizienz. Da  $k_{eff}$  für die ATP-inkubierte COX eher dem  $k_{eff2}$ -Wert als dem  $k_{eff1}$ -Wert der Kontrolle ähnelte, wurden die Werte für die ATP-haltige COX als  $v_{Max2}$ ,  $K_{M2}$  und  $k_{eff2}$  bezeichnet.

	Kontrolle	ATP	ADP
$v_{Max1} [s^{-1}]$	7,76	-	13,88
$v_{Max2} [s^{-1}]$	21,25	7,23	36,69
$K_{M1} [\mu M]$	2,24	-	1,04
$K_{M2} [\mu M]$	24,54	15,65	9,51
$k_{eff1} [\mu M^{-1} * s^{-1}]$	3,46	-	13,35
$k_{eff2} [\mu M^{-1} * s^{-1}]$	0,87	0,46	3,86

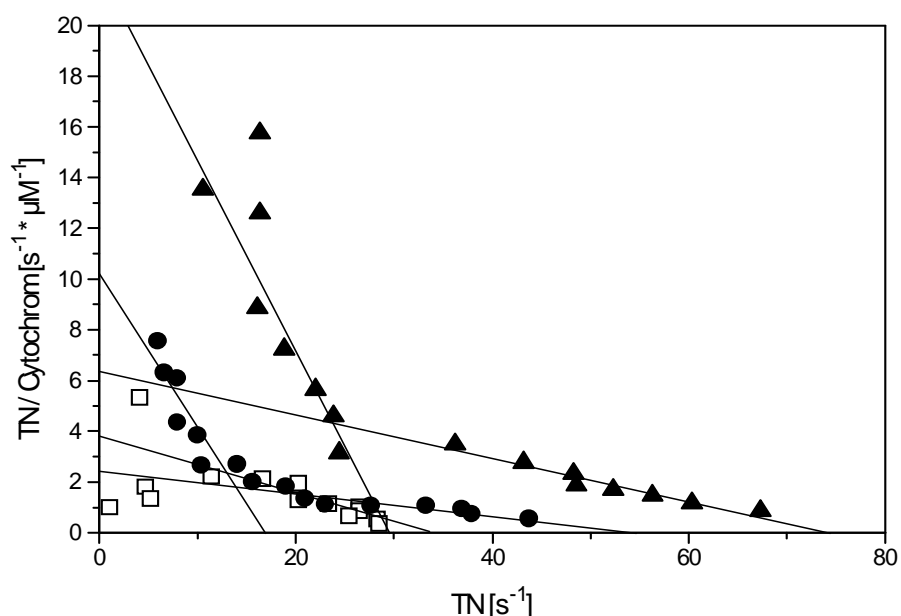
### 3.6.5 Aktivitätsmessungen in Gegenwart von TMPD

In der Literatur findet man häufig Aktivitätsmessungen, die in Gegenwart von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid (TMPD) durchgeführt wurden (Ferguson-Miller et al., 1976, Brooks and Nicholls, 1981, Büge and Kadenbach, 1986, Bisson et al., 1987, Lin et al., 1995b). TMPD sorgt für eine schnellere Reduktion von oxidiertem Cytochrom c durch Ascorbat. Um zu zeigen, ob die Anwesenheit von TMPD einen Einfluß auf die Wirkung der Nukleotide hatte, wurden Versuche in Gegenwart von TMPD mit in Tween 80 solubilisierter COX durchgeführt (Figur 46).



**Figur 46:** Aktivität löslicher COX in Gegenwart von TMPD. Das Enzym (0.1  $\mu\text{M}$ ) wurde für 24 h bei 0 °C in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 10 mM Magnesiumchlorid und 1 % Tween 80 mit 5 mM ATP (geschlossene Kreise), 5 mM ADP (geschlossene Dreiecke) oder ohne Nukleotid (offene Quadrate) inkubiert. Unmittelbar vor der Messung der Aktivität wurde eine TMPD-Konzentration von 0.7 mM in der Meßzelle eingestellt.

Dieser Versuch zeigte eindeutig, daß die Unterschiede der Aktivität von ATP-inkubierter und ADP-inkubierter COX unabhängig von der Gegenwart von TMPD waren. Dies ließ den Schluß zu, daß die Wirkung der Nukleotide nicht durch Bindung an Cytochrom c, sondern durch Bindung an das Enzym erfolgte. Zur genaueren Auswertung wurden die Daten in einem Eadie - Hofstee - Plot aufgetragen (Figur 47).



**Figur 47:** Eadie - Hofstee - Plot für die Aktivität löslicher COX in Gegenwart von TMPD nach Inkubation für 24 h bei 0 °C mit ATP (geschlossene Kreise), ADP (geschlossene Dreiecke) oder ohne Nukleotid (offene Quadrate). Die Daten wurden der Figur 46 entnommen.

Ähnlich wie bei den Messungen in Gegenwart von Magnesiumchlorid konnte nicht in jedem Fall eine Zweiphasigkeit des Eadie - Hofstee - Plots festgestellt werden. Bei der Messung in Abwesenheit von Nukleotiden streuten die Werte für kleine Cytochrom c Konzentrationen derart, daß eine vernünftige Auswertung nicht möglich war. In Gegenwart von TMPD wurde sowohl in Gegenwart von ATP und ADP eine Erhöhung der  $v_{\text{Max}}$  - Werte beobachtet, so daß die katalytische Effizienz zunahm (Tabelle 10).

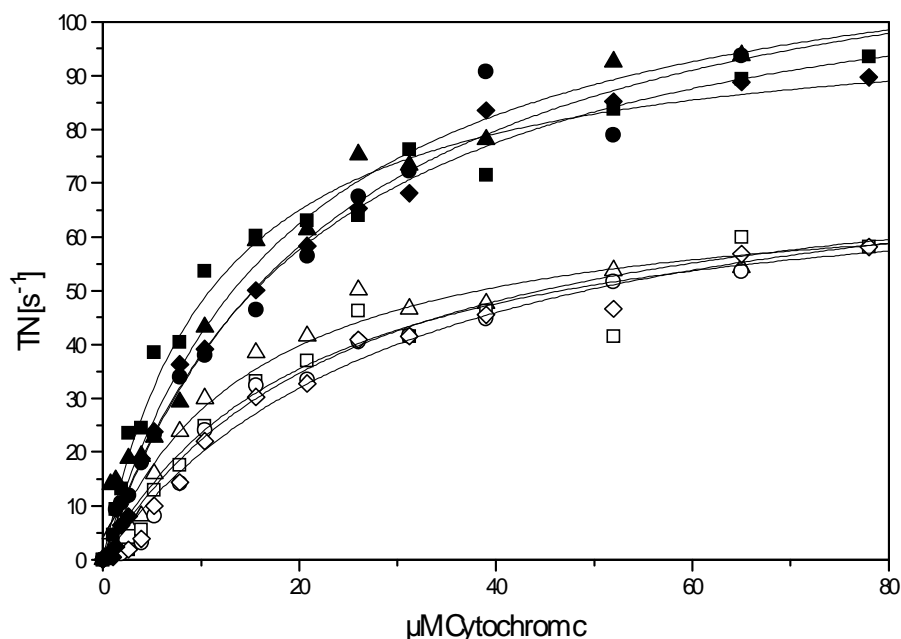
**Tabelle 10:**  $K_M$  und  $v_{\text{Max}}$  für Rinderherz-COX in Gegenwart von TMPD und Tween 80. Die Daten wurden Figur 47 entnommen.  $k_{\text{eff}}$  ist der Quotient aus  $v_{\text{Max}}$  und  $K_M$ . Da  $k_{\text{eff}}$  für die nukleotidfreie COX eher dem  $k_{\text{eff}2}$ -Wert als dem  $k_{\text{eff}1}$ -Wert der anderen Messungen ähnelte wurden die Werte für die nukleotidfreie COX als  $v_{\text{Max}2}$ ,  $K_{M2}$  und  $k_{\text{eff}2}$  bezeichnet.

	Kontrolle	ATP	ADP
$v_{\text{Max}1} [\text{s}^{-1}]$	-	16,92	29,45
$v_{\text{Max}2} [\text{s}^{-1}]$	33,54	55,41	74,21
$K_{M1} [\mu\text{M}]$	-	1,66	1,33
$K_{M2} [\mu\text{M}]$	8,94	22,66	11,63
$k_{\text{eff}1} [\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$	-	10,18	22,07
$k_{\text{eff}2} [\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$	3,75	2,45	6,38

### 3.6.6 Einfluß von monoklonalen Antikörpern auf die Aktivität in Gegenwart von Nukleotiden

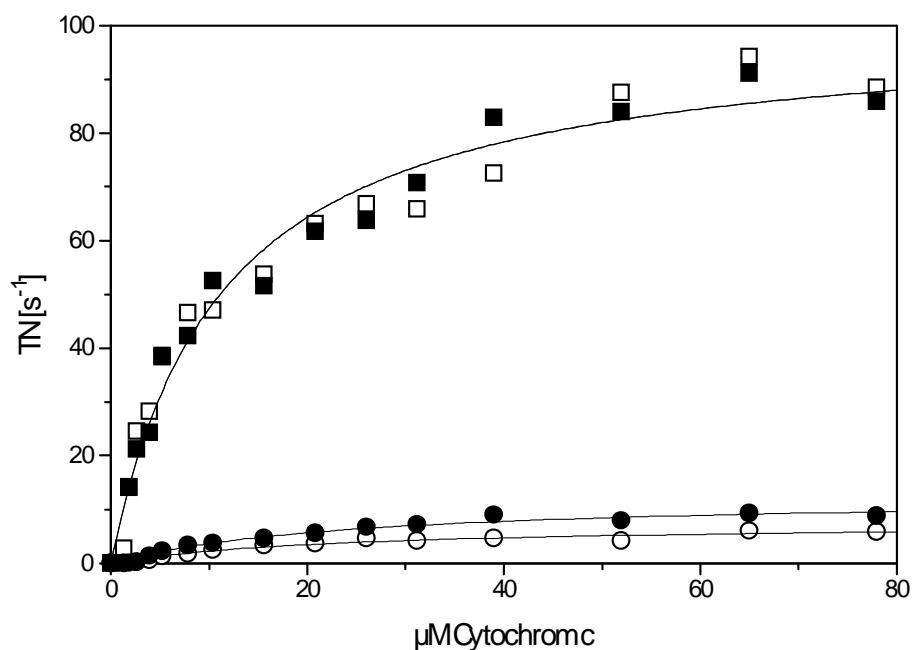
Um die Nukleotidbindungsstelle zu charakterisieren, die für die Wirkung von ATP und ADP auf die Aktivität verantwortlich war, wurde COX mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern in Gegenwart von Nukleotiden inkubiert. Nach 24 h bei 0 °C wurde die Aktivität bestimmt. Verwendet wurden dabei Antikörper gegen die Untereinheiten I, II/III, IV, Vab, VIa-H, VIc und VIIabc der COX. Bei den meisten dieser Antikörper wurden die nukleotidbedingten Unterschiede in der Aktivität des Enzyms nicht beeinflusst (Figur 48).

Da der Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc keinerlei Beeinflussung der Wirkung der Nukleotide auf die Atmung zeigte, dieser Antikörper aber die Regulation der  $H^+/e^-$  Stöchiometrie durch ATP aufhob (Frank and Kadenbach, 1996), konnte ein Zusammenhang zwischen Regulation der Protonenpumpaktivität und der Regulation der Atmungsrate ausgeschlossen werden.



**Figur 48:** Aktivitätsmessungen in Gegenwart verschiedener monoklonaler Antikörper bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP oder ADP. Das Enzym (0.1  $\mu$ M) wurde für 24 h bei 0 °C in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA und 1 % Tween 20 mit 5 mM ATP (offene Symbole) oder 5 mM ADP (geschlossene Symbole) sowie einem fünffachem Überschuß Antikörper inkubiert. Die Antikörper banden dabei spezifisch an die Untereinheiten II/III (AK 203; Quadrat), Vab (AK 81F9; Kreise), VIaH+VIc (AK 376; Dreiecke) oder VII (AK S5+; Karos)

Lediglich die Antikörper gegen die Untereinheiten I und IV der COX beeinflussten die Aktivität der COX. Der Antikörper gegen die Untereinheit I der COX (AK 230) führte zu einer drastischen Verminderung der Aktivität, jedoch blieb der Unterschied zwischen ATP- und ADP-inkubierter COX bestehen. Der Antikörper gegen die Untereinheit IV der COX (AK 68H9) hob die Unterschiede der Wirkung der beiden Nukleotide auf, wobei die ATP-inkubierte COX durch die Anwesenheit des Antikörpers stimuliert wurde, während die Aktivität des ADP-inkubierten Enzyms nahezu identisch war (Figur 49). Dies läßt den Schluß zu, daß die COX nicht durch ADP stimuliert wird, sondern durch ATP gehemmt und das der Antikörper gegen die Untereinheit IV lediglich die Hemmung aufhebt. Außerdem schließt dieser Befund aus, daß eine Bindung der Nukleotide an Cytochrom c Ursache für die Unterschiede ist, da sich diese nicht durch einen Antikörper aufheben ließe.

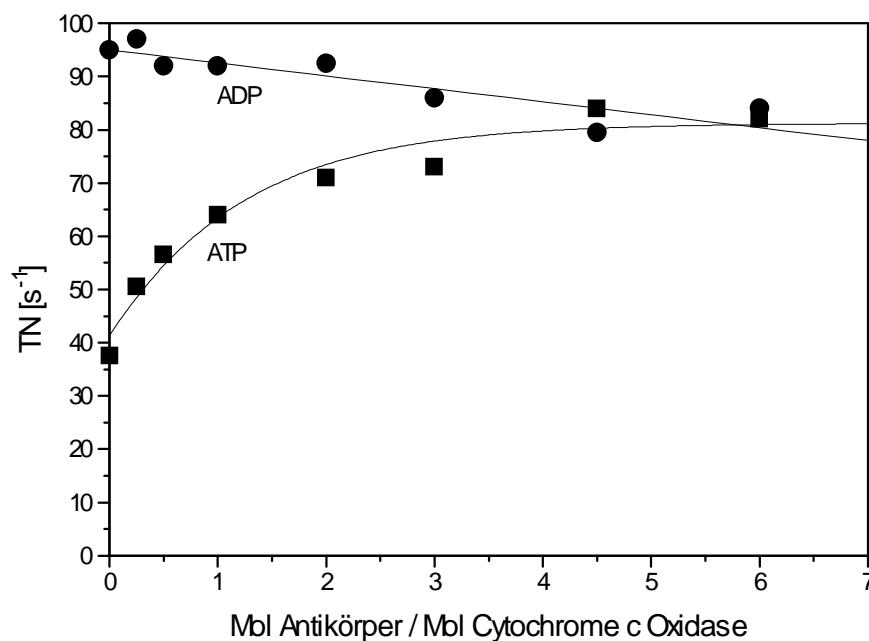


**Figur 49:** Aktivitätsmessungen in Gegenwart verschiedener monoklonaler Antikörper gegen Untereinheiten der COX bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP oder ADP. 0.1  $\mu\text{M}$  Rinderherz-COX wurde für 24 h bei 0 °C in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA und 1 % Tween 20 mit 5 mM ATP (offene Symbole) oder 5 mM ADP (geschlossene Symbole) sowie einem fünffachem Überschuß Antikörper inkubiert. Die Antikörper banden dabei spezifisch an die Untereinheiten I (AK 230, Kreise) oder IV (AK 68H9, Quadrate).

Da der Antikörper gegen die Untereinheit I zwar die Aktivität des Enzyms drastisch reduzierte, aber die Wirkung der Nukleotide nicht aufhob, wurde die Wirkung dieses Antikörpers nicht weiter untersucht.



Für den Antikörper 68H9, der an die Untereinheit IV der COX bindet, wurde das Antikörper / Enzym - Verhältnis bestimmt, bei dem eine vollständige Aufhebung der Hemmung durch ATP zu beobachten war. Dazu wurde die Konzentration des gereinigten Antikörpers durch einen Bradford-Test (siehe 2.5.) bestimmt. Anschließend wurde COX mit definierten Mengen Antikörper sowie jeweils mit einer Nukleotidkonzentration von 5 mM inkubiert und die Aktivität der verschiedenen Enzymproben wurde bei konstanter Cytochrom c Konzentration bestimmt (Figur 50).



**Figur 50:** Wirkung eines Antikörpers gegen Untereinheit IV (68H9) der COX bei verschiedenen Antikörper / COX - Verhältnissen. Das Enzym (0.1  $\mu$ M) wurde für 24 h bei 0 °C in Gegenwart der angegebenen Mengen gereinigten Antikörpers in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 % Tween 20 mit 5 mM ATP (Quadrate) oder 5 mM ADP (Kreise) inkubiert. Die Atmungsrate wurde bei einer Cytochrom c Konzentration von 52  $\mu$ M gemessen.

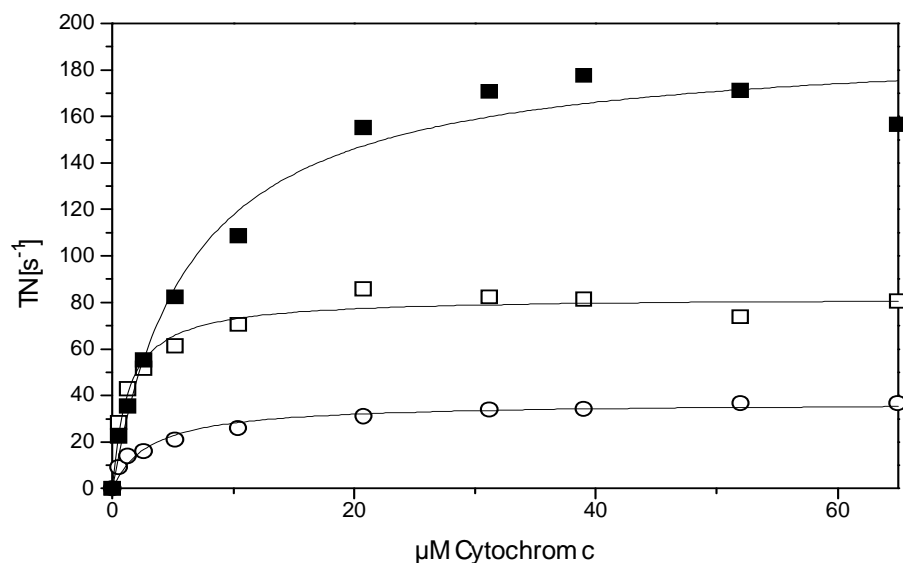
Bereits bei einem Antikörper / COX - Verhältnis (c / c) von eins war der Unterschied in den Atmungsraten um etwa die Hälfte vermindert. Bei einem Verhältnis von 5 Mol Antikörper / Mol COX war jeglicher Unterschied zwischen der Aktivität ATP-inkubierter und ADP-inkubierter COX aufgehoben. Die Wirkung des Antikörpers war unabhängig davon, ob COX erst mit Nukleotiden oder erst mit Antikörper inkubiert wurde.

### 3.7 Wirkung von Nukleotiden auf das rekonstituierte Enzym

#### 3.7.1 Bestimmung der Atmungsrate

In der Natur ist die Cytochrom c Oxidase in der inneren Mitochondrienmembran der Zellen lokalisiert. Neben der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser werden von dem Enzym zusätzlich Protonen über die Mitochondrienmembran transportiert. Dadurch kommt es zu einem Protonenunterschuss in den Mitochondrien und einem Protonenüberschuß ausserhalb, es entsteht ein Protonengradient. Je größer dieser Gradient ist, desto größer ist das Potential gegen das die COX gegenarbeiten muß. Das bedeutet, daß der Protonengradient einen direkten Einfluß auf die Enzymaktivität hat.

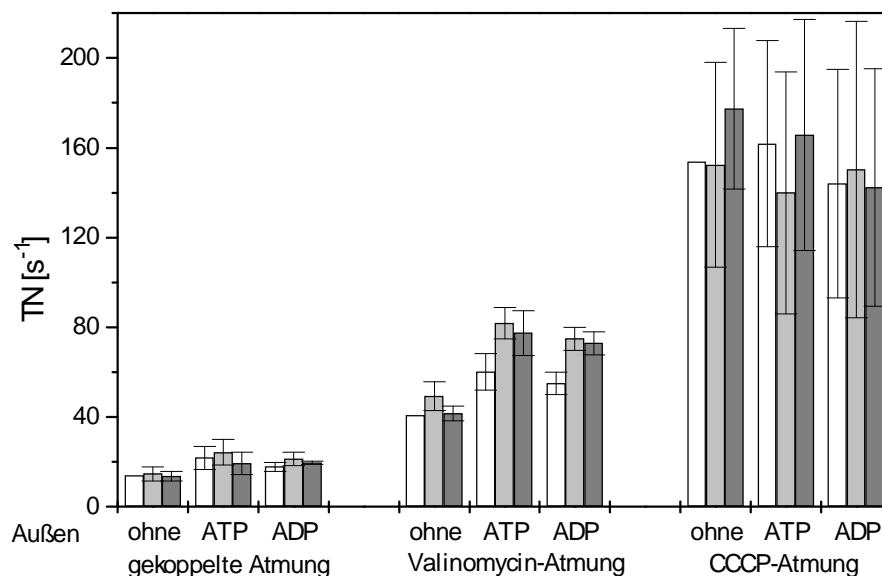
Die Untersuchung am löslichen Enzym ermöglicht keine Untersuchung in Abhängigkeit vom Protonengradienten. Um COX in einer der Natur ähnlicheren Umgebung zu untersuchen, wurde das Enzym in künstliche Vesikel eingebaut.



**Figur 51:** Beispiel für die Atmungsraten von rekonstituierter COX bei verschiedenen Membranzuständen. 3  $\mu\text{M}$  COX wurde mit 40 mg / mL Asolectin in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4, 1.5 % Natriumcholat in Anwesenheit von 5 mM ADP über XAD-2 für 22 h bei 0° C rekonstituiert. Anschließend wurden die Liposomen für 24 h bei 0 °C gegen das 200-fache Volumen 40 mM K-Hepes, pH 7.4 dialysiert. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 20 nM COX in 40 mM K-Hepes, pH 7.4 in die Meßzelle gegeben und die Atmungsrate in einem Cytochrom c Bereich von 0 - 65  $\mu\text{M}$  im Zustand gekoppelter (offene Kreise), Valinomycin-entkoppelter (offene Quadrate) sowie völlig entkoppelter Atmung (geschlossene Quadrate) bestimmt.

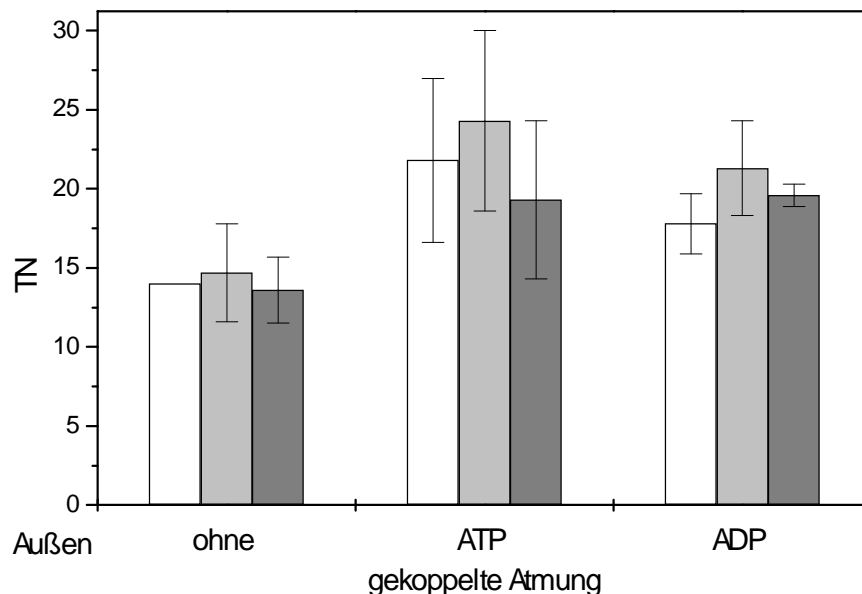
Bei der Untersuchung der Wirkung von ATP und ADP auf rekonstituierte COX wurden die inneren Variationen (ohne Nukleotid, ATP, ADP) mit allen äußeren Variationen (ohne Nukleotid, ATP, ADP) kombiniert sowie bei allen Atmungszuständen (gekoppelt, Valinomycin-entkoppelt, völlig entkoppelt) untersucht. Bei jeder möglichen Variante wurden Titrationen von rekonstituierter COX durchgeführt.

Aus den Titrationenskurven (Figur 51) wurde  $v_{\text{Max}}$  ermittelt (Figur 52 und 53), sowie die Cytochrom c Konzentration bestimmt, bei der  $v_{\text{Max}} / 2$  als Atmungsrate gemessen wurde. Diese Konzentration ( $K_{1/2}$ ) hängt von der Cytochrom c Affinität gegenüber der COX ab (Figur 54).



**Figur 52:** Maximalgeschwindigkeit der Atmungsrate von COX. 3  $\mu\text{M}$  COX wurde mit Asolectin (40 mg / mL) in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4, 1.5 % Natriumcholat in Gegenwart von 5 mM ADP (dunkelgraue Balken), 5 mM ATP (hellgraue Balken) oder ohne Nukleotid (weiße Balken) über XAD-2 für 22 h bei 0°C rekonstituiert. Anschließend wurden die Liposomen gegen das 200-fache Volumen 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 bei 0°C für 24 h in Abwesenheit von Nukleotiden dialysiert. Nach der Dialyse wurde den Proben 5 mM des angegebenen Nukleotids zugefügt und für 4 h bei 0°C inkubiert. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 20 nM COX in 40 mM K-Hepes, pH 7.4 in die Meßzelle gegeben und die Atmungsrate in einem Cytochrom c Bereich von 0 - 65  $\mu\text{M}$  im Zustand gekoppelter, Valinomycin-entkoppelter sowie völlig entkoppelter Atmung ermittelt.

Zur besseren Darstellung wurden die Daten für die gekoppelte Atmung aus Figur 52 in einer eigenen Grafik aufgetragen (Figur 53).

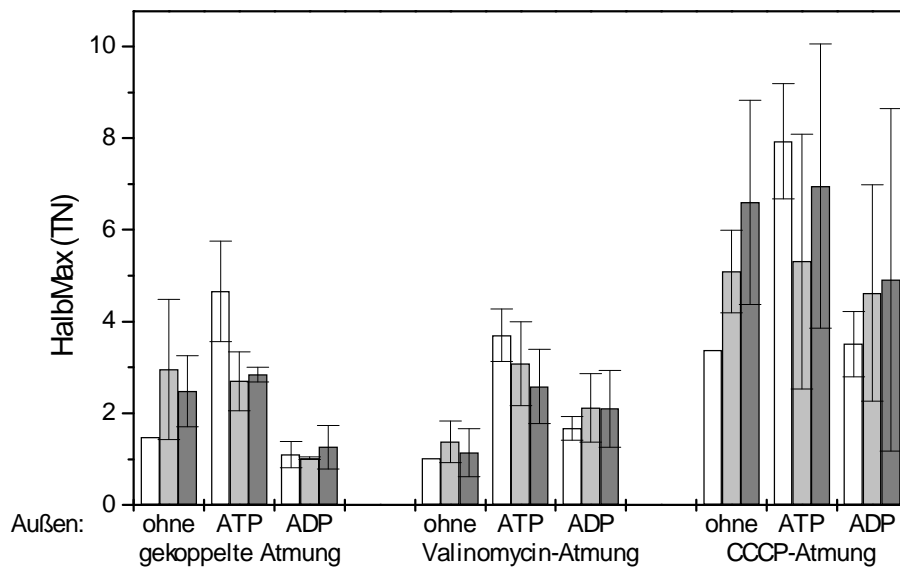


**Figur 53:** Ausschnitt aus Figur 52 zur besseren Darstellung der Werte für die gekoppelte Atmung

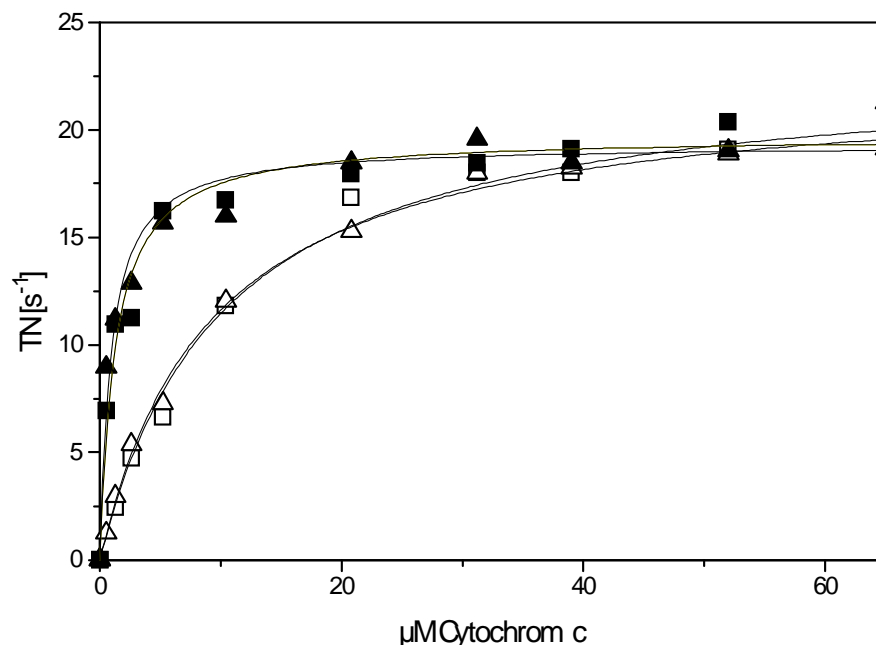
Die Bestimmung der  $v_{\text{Max}}$ -Werte zeigte, daß bei keinem Membranzustand ein signifikanter Unterschied in der Maximalgeschwindigkeit der Atmung für die verschiedenen Kombinationen von innerem und äußerem Nukleotid auftrat. Es zeigte sich lediglich, daß ein Fehlen von äußerem Nukleotid zu einer Erniedrigung der Maximalgeschwindigkeit sowohl im Falle der gekoppeltem Atmung als auch der valinomycin-entkoppelten Atmung führte. Zwar waren die Werte für die gekoppelte Atmung im Falle von äußerem ATP höher als die bei äußerem ADP, aber die Unterschiede waren kleiner als der statistische Fehler und ließen somit keine Aussage zu.

Auffallend war die große Streuung der Werte für die völlig entkoppelte Atmung. Diese Streuung war dabei unabhängig von der Gegenwart innerer oder äußerer Nukleotide.

Bei der Bestimmung von  $K_{1/2}$  waren Unterschiede für die Affinität der COX für Cytochrom c feststellbar (Figur 54). Unabhängig vom inneren Nukleotid war die Affinität in Gegenwart von äußerem ADP bei der gekoppelten Atmung deutlich höher als in Gegenwart von ATP ohne das sich der Maximalwert der Atmungsrate signifikant änderte (Figur 55). Diese Affinitätserhöhung schien sich auch bei der valinomycin-entkoppelten und bei der völlig entkoppelten ähnlich wie bei der löslichen COX abzuzeichnen (vergleiche Tabelle 7), jedoch war die Streubreite in Gegenwart von Valinomycin oder CCCP derart groß, daß keine sinnvollen Aussagen über die Affinität möglich waren.



**Figur 54:** Abschätzung der Affinität rekonstituierter COX für Cytochrom c in Gegenwart von Adeninnukleotiden. 3  $\mu\text{M}$  COX wurde mit Asolecithin (40 mg / mL) in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4, 1.5 % Natriumcholat in Gegenwart von 5 mM ADP (dunkelgraue Balken), 5 mM ATP (hellgraue Balken) oder ohne Nukleotid (weiße Balken) über XAD-2 für 22 h bei 0°C rekonstituiert. Anschließend wurden die Liposomen gegen das 200-fache Volumen 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 bei 0°C für 24 h dialysiert. Nach der Dialyse wurde den Proben 5 mM des angegebenen Nukleotids zugefügt und für 4 h bei 0°C inkubiert. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 20 nM COX in 40 mM K-Hepes, pH 7.4 in die Meßzelle gegeben und die Atmungsrate in einem Cytochrom c Bereich von 0 - 65  $\mu\text{M}$  im Zustand gekoppelter, Valinomycin-entkoppelter sowie völlig entkoppelter Atmung ermittelt. Aus den Titrationskurven wurde die Cytochrom c Konzentration ( $K_{1/2}$ ) mathematisch bestimmt, bei der die halbmaximale Atmungsrate ( $v_{\text{Max}} / 2$ ) gemessen wurde und diente als Maß für die Affinität. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der statistischen Auswertung von vier unabhängigen Messungen.

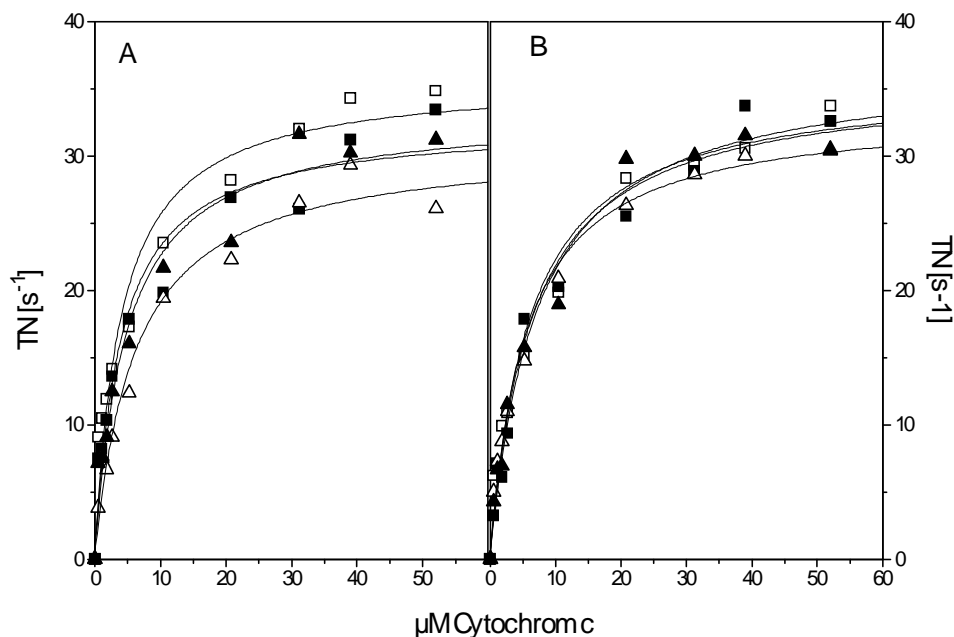


**Figur 55:** Bestimmung der Aktivität rekonstituierter Rinderherz-COX in Abhängigkeit intra- und extraliposomaler Nukleotide. 3  $\mu\text{M}$  COX wurde mit 40 mg / mL Asolectin in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4, 1.5 % Natriumcholat in Anwesenheit von 5 mM ATP (Vierecke) oder 5 mM ADP (Dreiecke) über XAD-2 für 22 h bei 0°C rekonstituiert. Anschließend wurden die Liposomen für 24 h bei 0 °C gegen das 200-fache Volumen 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 dialysiert. Nach der Dialyse wurde 5 mM extraliposomales ATP (offene Symbole) oder 5 mM ADP (geschlossene Symbole) zugegeben. Zur Bestimmung der Aktivität wurden in der Meßzelle 20 nM COX in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 gegeben und es wurde die Atmungsrate in einem Cytochrom c Bereich von 0 - 65  $\mu\text{M}$  im Zustand gekoppelter Atmung bestimmt.

### 3.7.2 Wirkung eines Antikörpers gegen die Untereinheit IV auf die gekoppelte Atmung

Am solubilisierten Enzym ließen sich nukleotidinduzierte Unterschiede von  $K_M$  und  $v_{\text{Max}}$  durch Zugabe eines Antikörpers gegen die Untereinheit IV aufheben. Deshalb wurde auch am rekonstituierten Enzym die Wirkung des Antikörpers auf die Atmungsrate in Gegenwart von intra- und extraliposomalen Nukleotiden untersucht (Figur 56). Dabei zeigte sich, daß die Unterschiede in der Affinität für Cytochrom c, die in Abhängigkeit der extraliposomalen Nukleotide bestimmt werden konnte, in Gegenwart des Antikörpers gegen die Untereinheit IV nicht mehr vorhanden waren. Neben der Aufhebung der Affinitätsunterschiede konnte eine Stimulierung der Aktivität in Gegenwart des Antikörpers um etwa 60 % beobachtet werden (Tabelle 11). Diese Stimulierung war dabei unabhängig von

intra- und extraliposomalen Nukleotiden. Die Unterdrückung der Affinitätsunterschiede für Cytochrom c trat sowohl auf, wenn der Antikörper intra- und extraliposomal zugegeben (Figur 56 B) oder wenn der Antikörper nach der Rekonstitution extraliposomal zugesetzt wurde (Figur 56 A). Dieser Befund ließ den Schluß zu, daß der Antikörper von der cytosolischen Seite an die Untereinheit IV bindet.

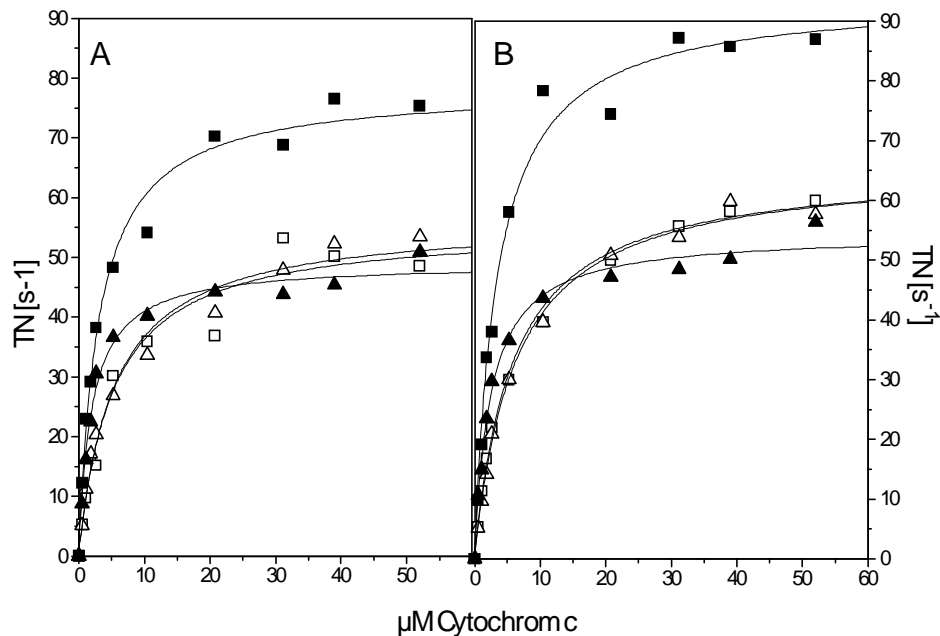


**Figur 56:** Bestimmung der Aktivität rekonstituierter Rinderherz-COX in Abhängigkeit intra- und extraliposomaler Nukleotide in Anwesenheit eines Antikörpers gegen die Untereinheit IV der COX. 3  $\mu\text{M}$  COX wurde mit 40 mg / mL Asolectin in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4, 1.5 % Natriumcholat in Anwesenheit von 5 mM ATP (Quadrate) oder 5 mM ADP (Dreiecke) über XAD-2 für 22 h bei 0°C rekonstituiert. Anschließend wurden die Liposomen für 24 h bei 0 °C gegen das 200-fache Volumen 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 dialysiert. In einer Versuchsserie wurde der Antikörper bereits während der Rekonstitution zugegeben (B), in einer zweiten Versuchsserie erst nach der Dialyse (A). Vor der Messung der Atmungsrate wurde 5 mM extraliposomales ATP (offene Symbole) oder 5 mM ADP (geschlossene) zugegeben. Zur Bestimmung der Aktivität wurden in der Meßzelle 20 nM COX in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 gegeben und es wurde die Atmungsrate in einem Cytochrom c Bereich von 0 - 52  $\mu\text{M}$  im Zustand gekoppelter Atmung bestimmt.

### 3.7.3 Wirkung eines Antikörpers gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc auf die gekoppelte Atmung

Um die Zusammenhänge zwischen der Elektronentransfergeschwindigkeit und  $\text{H}^+/\text{e}^-$  - Stöchiometrie näher zu bestimmen, wurde untersucht, ob der Antikörper

gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc der COX, der die Regulation der  $H^+/e^-$ -Stöchiometrie durch das intraliposomale ATP/ADP - Verhältnis aufhebt, auch eine Wirkung auf die Atmungsrate hat (Figur 57).



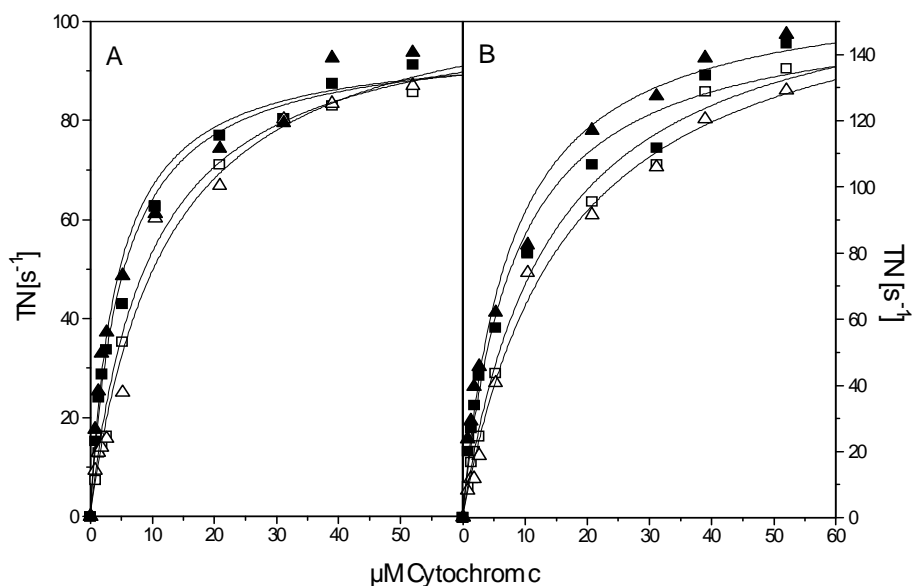
**Figur 57:** Bestimmung der Aktivität rekonstituierter Rinderherz-COX in Abhängigkeit intra- und extraliposomaler Nukleotide in Anwesenheit eines Antikörpers gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc der COX. 3  $\mu$ M Rinderherz-COX wurden mit 40 mg / mL Asolectin in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4, 1.5 % Natriumcholat in Anwesenheit von 5 mM ATP (Vierecke) oder 5 mM ADP (Dreiecke) über XAD-2 für 22 h bei 0°C rekonstituiert. Anschließend wurden die Liposomen für 24 h bei 0 °C gegen das 200-fache Volumen 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 dialysiert. In einer Versuchsserie wurde der Antikörper nach der Dialyse zugegeben (A), in einer anderen bereits während der Rekonstitution (B). Vor der Messung der Aktivität wurde 5 mM extraliposomales ATP (offene Symbole) oder 5 mM ADP (geschlossene Symbole) zugegeben. Zur Bestimmung der Aktivität wurden in der Meßzelle 20 nM COX in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 gegeben und es wurde die Atmungsrate in einem Cytochrom c Bereich von 0 - 52  $\mu$ M im Zustand gekoppelter Atmung bestimmt.

In Gegenwart des Antikörpers gegen VIa-H, VIc der COX war weiterhin eine erhöhte Affinität der COX für Cytochrom c zu beobachten. Gleichzeitig wurde  $v_{\text{Max}}$  gegenüber unbehandeltem Enzym stark erhöht. Bei Anwesenheit von 5 mM intraliposomalem ATP und 5 mM extraliposomalem ADP wurde  $v_{\text{Max}}$  auf das 4.5-fache erhöht, in allen anderen Fällen auf das 3-fache. Die zusätzliche Stimulierung der Maximalgeschwindigkeit bei intraliposomalen ATP und extraliposomalen ADP wird bereits durch extraliposomal zugegebenen Antikörper verursacht, ebenso wie die prinzipielle Erhöhung der Aktivitäten. Die Zugabe des Antikörpers während der Rekonstitution, wodurch eine intraliposomale Bindung



des Antikörpers ermöglicht wurde, führte zu einer zusätzlichen Erhöhung der Atmungsraten, unabhängig von der intra- und extraliposomalen Nukleotidzusammensetzung (Tabelle 11).

Der in der letzten Versuchsreihe verwendete Antikörper bindet an zwei verschiedene Untereinheiten, an die V1c und an die herzspezifische Untereinheit V1a-H. Um zu unterscheiden, welche dieser beiden Untereinheiten für die beobachteten Effekte verantwortlich war, wurden Versuche mit aus Rinderniere isolierter COX durchgeführt. Rindernieren-COX entspricht von der Untereinheitenstruktur dem Leberenzym.



**Figur 58:** Bestimmung der Aktivität rekonstituierter Rindernieren-COX in Abhängigkeit intra- und extraliposomaler Nukleotide. Die Messungen wurden ohne Antikörper (A) oder in Anwesenheit eines Antikörpers gegen die Untereinheiten V1aH+V1c der COX durchgeführt, der nach der Dialyse zugegeben wurde. 3  $\mu\text{M}$  Rinderherz-COX wurde mit 40 mg / mL Asolectin in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4, 1.5 % Natriumcholat in Anwesenheit von 5 mM ATP (Quadrate) oder 5 mM ADP (Dreiecke) über XAD-2 für 22 h bei 0°C rekonstituiert. Anschließend wurden die Liposomen für 24 h bei 0 °C gegen das 200-fache Volumen 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 dialysiert. Vor der Messung der Aktivität wurde 5 mM extraliposomales ATP (offene Symbole) oder 5 mM ADP (geschlossene Symbole) zugegeben. Zur Bestimmung der Aktivität wurden in der Meßzelle 20 nM COX in 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7.4 gegeben und es wurde die Atmungsrate in einem Cytochrom c Bereich von 0 - 52  $\mu\text{M}$  im Zustand gekoppelter Atmung bestimmt.

Damit Aussagen über die Wirkung des Antikörpers möglich waren, wurde zuerst die Atmung der rekonstituierten COX bei verschiedenen intra- und extraliposomalen Nukleotidzusammensetzungen gemessen (Figur 58 A). In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Antikörper zur rekonstituierten COX dazugegeben und ebenfalls die Aktivität des Enzyms in Gegenwart von ATP und ADP bestimmt (Figur 58 B).

In Gegenwart des Antikörpers gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc, der bei diesem Enzym nur an die Untereinheit VIc binden konnte, wurde ebenfalls eine nukleotidunabhängige Erhöhung der Atmungsraten gefunden. Jedoch war diese Stimulierung deutlich schwächer als beim Herzenzym. Wurde dort eine Erhöhung von etwa 200 % gefunden, betrug diese bei der Nieren-COX nur etwa 60%. Trotzdem blieb die Atmungsrate der Nieren-COX aber bei jeder Nukleotidzusammensetzung in Gegenwart des Antikörpers höher als die entsprechende Atmungsrate des Herzenzyms.

**Tabelle 11:** Zusammenstellung der Werte für  $v_{\text{Max}}$  und  $K_{1/2}$  rekonstituierter COX bei verschiedenen Nukleotidzusammensetzungen. Die Messungen wurden teils ohne, teils in Gegenwart der angegebenen Antikörper durchgeführt. Die Antikörper wurden entweder während der Rekonstitution (intra- und extraliposomal) oder erst nach der Dialyse (extraliposomal) zugegeben. Die Daten entstammen den Figuren 55 - 58.

Nukleotid-zusammensetzung		COX	Herz	Herz	Herz	Herz	Herz	Niere	Niere
		AK	-	IV	IV	VIa-H, VIc	VIa-H, VIc	-	VIa-H, VIc
innen	außen	Ort	-	außen	außen + innen	außen	außen + innen	-	außen
ATP	ATP	$v_{\text{Max}}$ $K_{1/2}$	22,09 10,13	35,73 3,96	35,65 6,01	55,15 5,26	65,65 5,85	103,88 9,46	167,75 13,90
ADP	ATP	$v_{\text{Max}}$ $K_{1/2}$	21,31 9,17	30,96 6,24	36,85 7,13	56,33 5,36	65,92 6,27	109,22 12,05	168,57 16,44
ATP	ADP	$v_{\text{Max}}$ $K_{1/2}$	20,71 1,25	32,46 3,96	33,43 5,47	78,34 3,03	94,08 3,45	96,67 5,10	154,94 8,19
ADP	ADP	$v_{\text{Max}}$ $K_{1/2}$	20,32 0,93	33,25 4,75	35,65 6,35	49,04 1,99	54,35 2,44	95,66 4,37	161,4 7,51

Eine zusätzliche Stimulierung der Atmungsrate in Gegenwart des Antikörpers sowie intraliposomalem ATP und extraliposomalem ADP konnte anders als beim Herzenzym nicht beobachtet werden. Dies bedeutet, daß dieser Effekt beim Herzenzym unter anderem durch die isoformspezifische Untereinheit VIa-H verursacht wurde. Da jedoch dieser Effekt abhängig von dem jeweiligen intra- und extraliposomalen Nukleotid ist, ist es durchaus möglich, daß mehrere Untereinheiten für diese Erscheinung verantwortlich sind.

### 3.8 Zusammenfassung der Aktivitätsuntersuchungen

Ähnlich wie bei den Bindungsstudien konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, daß die Beeinflussung der Aktivität durch Nukleotide am löslichen Enzym zeitabhängig ist (Figur 41). Auch konnte gezeigt werden, daß das Detergenz eine entscheidende Rolle bei der Wirkung von Nukleotiden spielt. So wird in Laurylmaltosid keinerlei Effekt durch Zugabe von Nukleotiden beobachtet (Figur 38), während in Tween 20 und Tween 80 die Atmungsraten in Gegenwart von ATP deutlich niedriger sind als in Gegenwart von ADP (Figur 36 und 38). Diese Unterschiede sind unabhängig von der Magnesiumkonzentration (Figur 44) oder von der Anwesenheit von TMPD (Figur 46). Diese beiden Effektoren haben zwar Einfluß auf die Atmungsraten, jedoch bleiben die nukleotidabhängigen Unterschiede bestehen. Bei der Auswertung der einzelnen Meßreihen zeigte sich, daß durch die Anwesenheit von Nukleotiden nicht nur die Maximalgeschwindigkeit erhöht wird, sondern vor allem die Affinität der COX für Cytochrom c (Tabelle 7).

Durch Untersuchungen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, daß sich die nukleotidbedingten Unterschiede in Gegenwart eines Antikörpers gegen die Untereinheit IV der COX aufheben lassen.

Es konnte in dieser Arbeit belegt werden, daß die Nukleotidbindungsstelle, die die unterschiedlichen Aktivitäten verursacht, sowohl ADP als auch ATP binden. Zum einen wird allein durch Gegenwart von ADP die Atmungsraten gegenüber dem unbehandelten Enzym erhöht. Durch Vorinkubation durch ATP wurde bei Zugabe von ADP sofort eine Erhöhung der Aktivität gemessen. Der Zusatz von Antikörper gegen die Untereinheit IV erhöhte die Atmungsraten in Gegenwart von ATP auf die Aktivität der ADP-inkubierten COX. Dies bedeutet, daß die Aktivität in Gegenwart von ATP gehemmt wird und nicht in Gegenwart von ADP stimuliert.

Anders als beim löslichen Enzym konnte bei der rekonstituierten COX keine Veränderung von  $v_{\text{Max}}$  in Abhängigkeit von intra- oder extraliposomalen Nukleotiden gefunden werden (Figur 52). Es konnte jedoch eine Erhöhung der Affinität in Gegenwart von extraliposomalem ADP gezeigt werden (Figur 55). Diese Affinitätsstimulierung ist unabhängig vom intraliposomalen Nukleotid. Der Effekt ließ sich ähnlich wie beim löslichen Enzym durch extraliposomalen Zusatz eines Antikörpers gegen die Untereinheit IV der COX wieder aufheben (Figur 56).

Anders als beim löslichen Enzym wurde die Aktivität der rekonstituierten Herz-COX durch einen Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc beeinflusst. Neben einer allgemeinen Erhöhung der Atmungsraten trat eine zusätzliche Stimulierung auf, wenn intraliposomal ATP und extraliposomal ADP zugegen war

(Figur 57). Dabei bindet der Antikörper von der cytosolischen Seite an die COX. Dieser Effekt ist jedoch nur am Herzenzym sichtbar und tritt bei COX aus Rinderniere nicht auf (Figur 58). Dies zeigt, daß die herzspezifische Untereinheit der VIa eine Rolle bei dieser zusätzlichen Stimulierung spielte.

### 3.9 Theoretische Suche nach Bindungsstellen

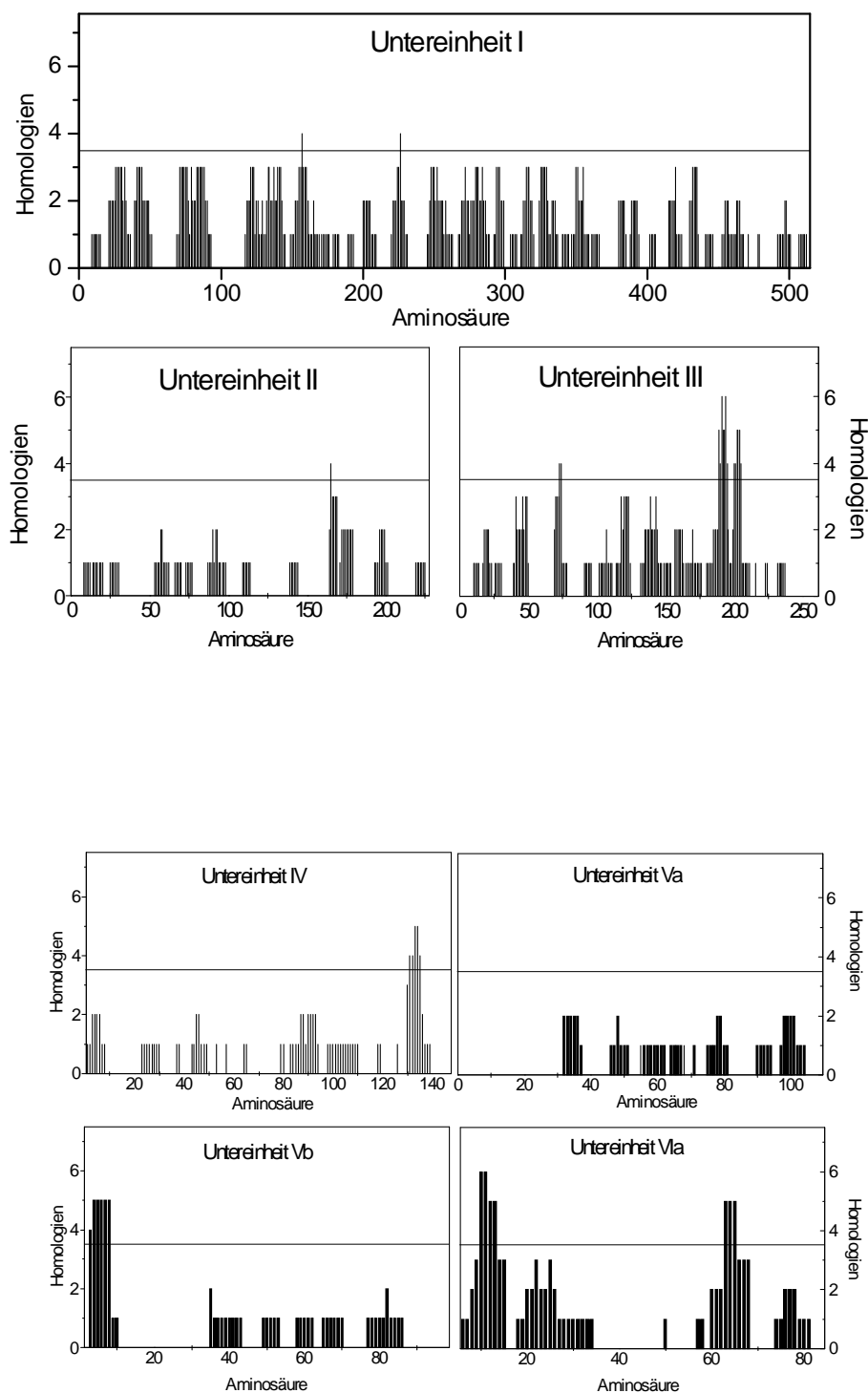
Im dritten Teil dieser Arbeit wurde versucht ATP- und ADP- Bindungsstellen nicht durch praktische Versuche, sondern durch theoretische Überlegungen näher zu bestimmen.

In der Literatur sind einige Sequenzmotive beschrieben, von denen bekannt ist, daß sie Adenosinreste erkennen und binden (Tabelle 12).

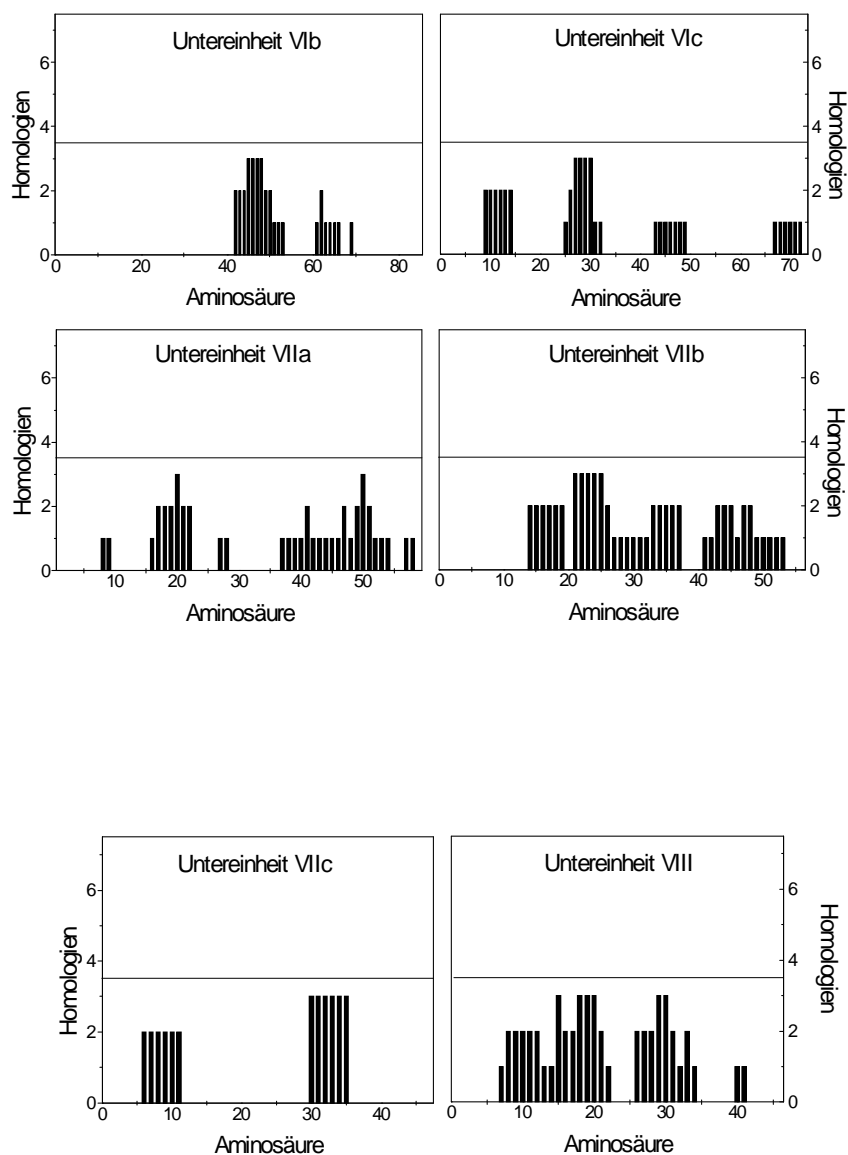
**Tabelle 12:** Adenosinbindende Sequenzmotive

Sequenzmotiv	Adenosinhaltige Gruppe	Literatur
GITPA	ADP	Edel et al. (1992)
EHTDVA	ADP	Edel et al. (1992)
GDGXX[T/S]	ATP	Ewart et al. (1991)
KTX <sub>6</sub> [V/I]	ATP	Walker et al. (1982)
GGYAKEM	NADH	Yamaguchi and Hatefi (1995)
GxGxx[V/G/A]	NADH	Olausson et al. (1993) Hu et al. (1992)
GxGVAG	NADH	Olausson et al. (1993)

Um Bindungsstellen für Adeninnukleotide bei der COX zu finden, wurde eine Annahme gemacht. Da alle Sequenzmotive dasselbe Substrat erkennen, sollten sie ähnliche Strukturelemente enthalten. Obwohl die meisten der Motive mehrmals die Aminosäure Glycin enthalten, ist es nicht nötig, daß Glycin im Motiv vorkommt. Da ähnliche räumliche Strukturen durch verschiedene Aminosäuresequenzen erzeugt werden können, wurde nach Sequenzen in der COX-Struktur gesucht, die strukturelle Homologien zu den Motiven besitzen. Zu diesem Zweck wurde ein Computerprogramm entworfen, daß die Homologiesuche durchführte. Die Kriterien für die Suche waren, neben der Ladung der jeweiligen Aminosäure, die Polarität, der aromatische Charakter, die Größe der Seitenkette, helixbildende oder -brechende Eigenschaften sowie faltblattbildende oder -brechende Charakteristika. Durch die Suche wurden viele Sequenzstücke innerhalb der COX gefunden, die Homologien zu einem oder mehreren Motiven zeigten. Die Annahme, daß die Bindungsstellen für Adeninnukleotide eine gemeinsame Struktur besitzen, bedingt, daß eine Bindungsstelle der COX Homologien zu mehreren Motiven besitzt. Dazu wurden die Ergebnisse der Homologiesuche grafisch aufgetragen (Figuren 59 und 60).



**Figur 59:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Homologiesuche für die Untereinheiten I - VIa der Rinderherz-COX. Die Linie in den einzelnen Plots trennt Bereiche hoher Homologien (oberhalb) von denen geringerer Homologien (unterhalb) ab.



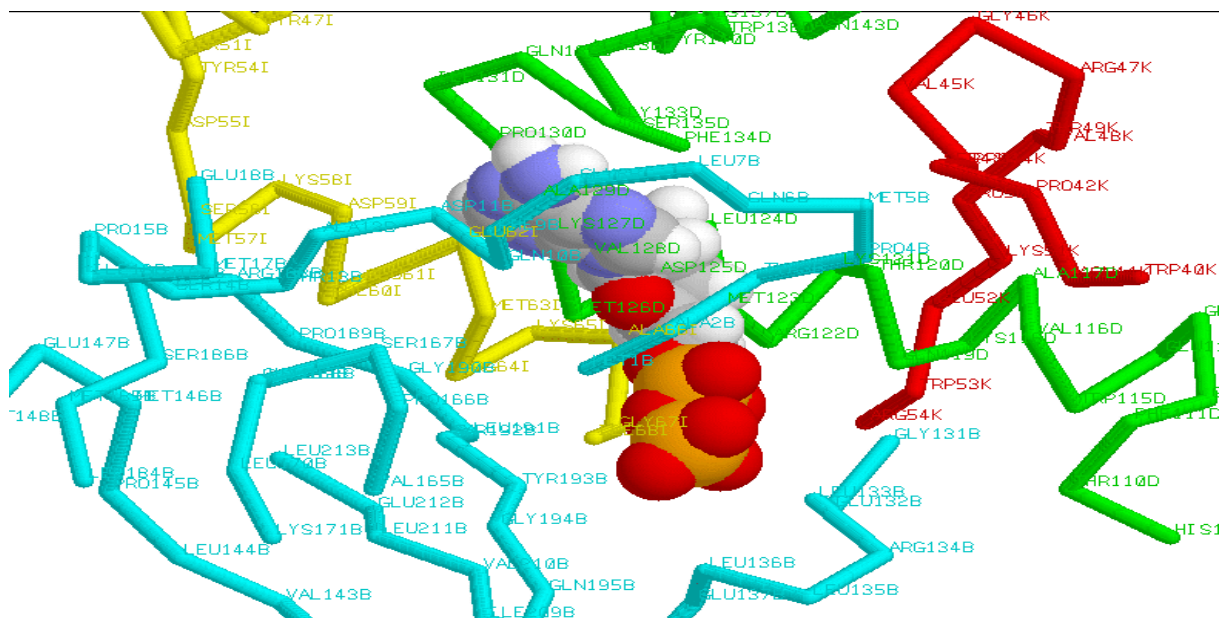
**Figur 60:** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Homologiesuche für die Untereinheiten VIb - VIII der Rinderherz-COX. Die Linie in den einzelnen Plots trennt Bereiche hoher Homologien (oberhalb) von denen geringerer Homologien (unterhalb) ab.



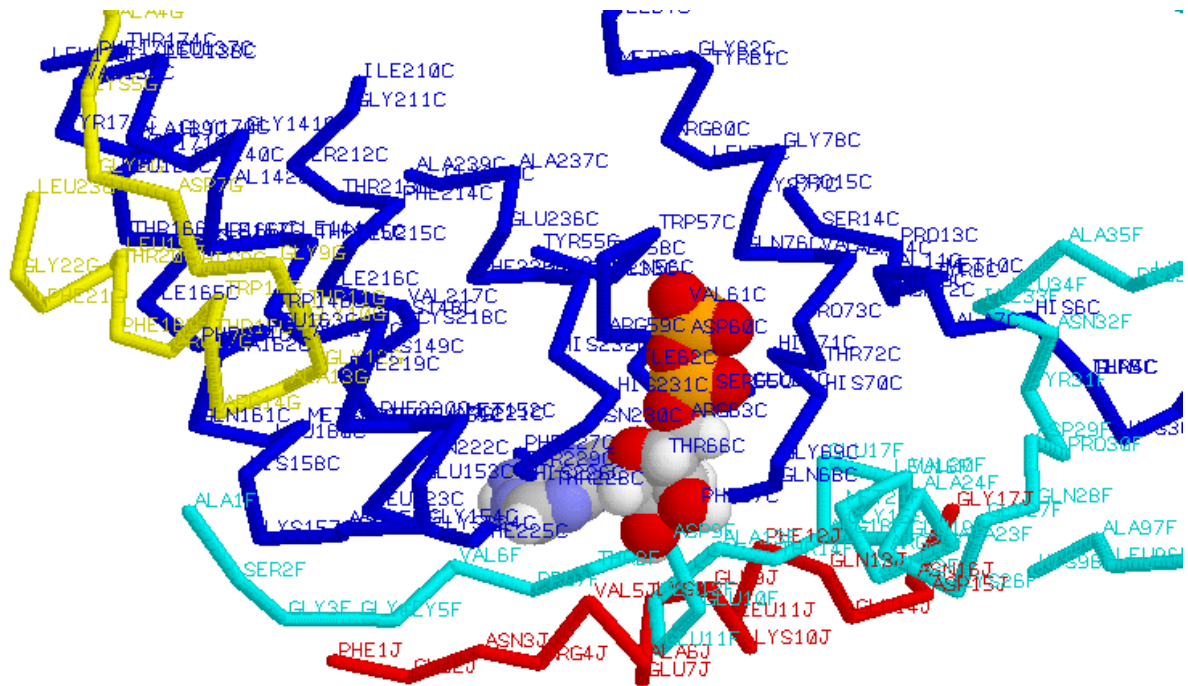
Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, daß zwar viele Sequenzbereiche in der Untereinheit I Homologien zu einer oder zwei der Sequenzmotive aufzeigen, sich aber kein Bereich als besonders homolog zu vielen Motiven herauskristallisiert hat. Ähnliches gilt für die restlichen Untereinheiten der COX. Es gibt jedoch 6 Ausnahmen.

In der Untereinheit III gibt es zwei Bereiche um die Aminosäure 200 herum, die hohe Homologien zu den untersuchten Motiven aufweisen. Dabei handelt es sich zum einen um den Sequenzbereich von Aminosäure 189 - 195 (SDGVYGS) sowie um den Bereich von Aminosäure 200 - 205 (ATGFHG). Betrachtet man diese beiden Motive in der Raumstruktur, so sind beide Motive Bestandteile der Helix 6 der Untereinheit III. In beiden Fällen ist die nähere Umgebung dicht von anderen Aminosäuren der COX umgeben, so daß eine Bindung von ADP an diesen Stellen sehr unwahrscheinlich erscheint.

Innerhalb der Untereinheit IV gibt es auch einen Bereich, der Ähnlichkeiten zu mehreren der Sequenzmotive aufweist. Dieser Bereich reicht von Aminosäure 130 - 135 (PIQGF<sub>S</sub>) und liegt auf der cytosolischen Seite der COX in der Nähe der Untereinheit II. Hier gibt es Raum genug, um ein ADP-Molekül optisch in die Struktur der COX zu fitten. Dabei ergibt sich die Möglichkeit, daß der negativ geladene Diphosphatrest des ADP durch das Arg<sub>134</sub> der Untereinheit II stabilisiert wird (Figur 61). Falls dies tatsächlich eine ADP- oder ATP-Bindungsstelle sein sollte, könnte dieser Argininrest für die unterschiedliche Reaktion auf die Bindung von ADP oder ATP verantwortlich sein.



**Figur 61:** Hypothetische Bindungsstelle für ADP oder ATP an der Untereinheit IV der COX. Grün: Untereinheit IV, gelb: Untereinheit VIc, blau: Untereinheit II, rot: Untereinheit VIIb, mehrfarbig: ADP-Molekül. Nicht bindungsrelevante Gebiete der COX sind ausgeblendet.

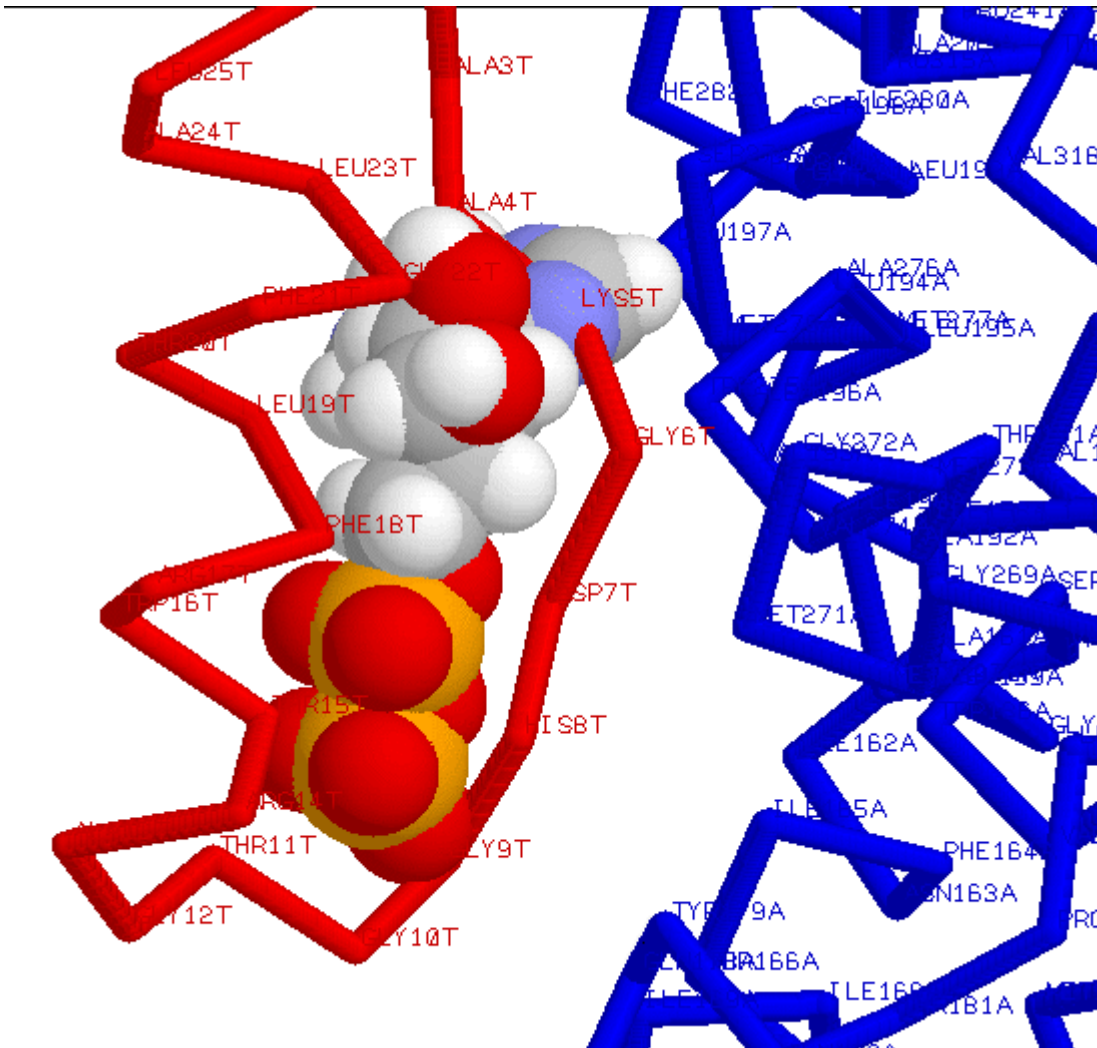


**Figur 62:** Mögliche Bindungsstelle an der Untereinheit Vb der COX aus Rinderherz. Hellblau: Untereinheit Vb, rot: Untereinheit VIIa, dunkelblau: Untereinheit III, gelb: Untereinheit VIa, bunt : ADP-Molekül. Für die Bindung nichtrelevante Gebiete der COX sind ausgeblendet.

Die vierte mögliche Adeninnukleotidbindungsstelle, die die Homologiesuche ergeben hat, liegt auf der Untereinheit Vb von Aminosäure 3 - 8 (GGGVPT). Diese Untereinheit liegt auf der Matrix-orientierten Seite der COX. Das optisch gefittete ADP-Molekül ist mit dem Diphosphatrest zwischen Helix 2 und 3 der Untereinheit III orientiert, wobei die negative Ladung von Arg<sub>59</sub> oder Arg<sub>80</sub> dieser Untereinheit stabilisiert werden könnte (Figur 62). Der freie Raum, der diese Bindungsstelle umgibt, reicht aus, um ein ATP-Molekül aufzunehmen, wodurch der Triphosphatrest näher an die beiden Argininreste gelangen würde.

Die beiden letzten möglichen Bindungsstellen sind beide auf der Untereinheit VIa lokalisiert und sind bereits in der Literatur beschrieben worden.

Die eine Bindungsstelle liegt auf der N-terminalen, matrixorientierten Seite und wird von den Aminosäuren 9 - 14 (GGTGAR) gebildet und entspricht in etwa der Bindungsstelle, die bereits von Tsukihara (1996) beschrieben wurde (Figur 63).



**Figur 63:** Bindungsstelle an der herzspezifischen Untereinheit VIa aus Rinderherz. Der optische Fit wurde nach den Daten von Tsukihara et al. (1996) angefertigt. Rot: Untereinheit VIa, blau: Untereinheit I des zweiten Monomers in der Dimerstruktur, mehrfarbig: ADP-Molekül. Für die Bindung nichtrelevante Gebiete der COX sind ausgeblendet.

Die letzte potentielle Bindungsstelle liegt auf der dem Cytosol zugewandten Seite der Untereinheit VIa in dem Bereich von Aminosäure 63 - 68 (GDGNHT). Dieses Sequenzstück ist Teil der von Taanman et al. (1994) vorausgesagten ADP/ATP - Bindungsstelle im Bereich von Aminosäure 63 - 75. Die Phosphatgruppen des Nukleotids können dabei zwischen die Helices 2 und 6 der Untereinheit III orientiert sein (Figur 64).

Insgesamt zeigte die computergestützte Suche nach Homologien zwischen bekannten Adenosinbindenden Motiven und der COX 6 Bereiche, von denen zwei aus strukturellen Gründen nicht für die Bindung geeignet sind. Die Übereinstimmung zwischen den beiden sich auf der VIa befindenden Bindungsstellen mit bereits in der Literatur beschriebenen Bindungsstellen, belegt, daß der Ansatz über ähnliche Strukturmerkmale bei Adenosinbindungsstellen nicht völlig von der Hand zu weisen ist.

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zur Bestimmung von ATP- und ADP-Bindungsstellen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Verfahren zur Bestimmung der Anzahl und Affinitäten von Adeninnukleotidbindungsstellen an COX verwendet. Zum einen wurde fluoreszenzphotometrisch die Bindung von TNP-ATP, einem ATP-Derivat, an die COX aus verschiedenen Geweben und Organismen untersucht. Die dabei gefundene Bindung von einem Molekül TNP-ATP pro Molekül COX aus *Paracoccus denitrificans* (2 UE) bestätigt die von Rieger (1995) mittels Gleichgewichtsdialyse gefundene Bindungsstelle für [<sup>35</sup>S]ATP $\alpha$ S an diesem Enzym.

Bei der Untersuchung von Rinder-COX mit TNP-ATP wurden 3 Bindungsstellen gefunden, unabhängig davon, ob das Enzym aus dem Herz oder der Leber isoliert wurde (Tabelle 2). In der Literatur sind bisher zwei Untersuchungen beschrieben worden, in denen versucht wurde die Anzahl der ATP-Bindungsstellen an COX durch Verwendung von TNP-ATP zu bestimmen (Reimann and Kadenbach, 1992, Taanman et al., 1994). In beiden Arbeiten wurde die Anzahl der TNP-ATP Bindungsstellen mit 2 pro Molekül COX bestimmt. Der Gegensatz der früheren Arbeiten zu den Ergebnissen in dieser Arbeit kann in der Art der Messung bei Reimann and Kadenbach begründet sein. Durch die Bindung von TNP-ATP an COX stieg die Extinktion von TNP-ATP im Absorptionsspektrum maximal um 5 %. Bei Untersuchung der Bindung von TNP-ATP an COX im Fluoreszenzspektrum, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, ändert sich die Extinktion sehr viel stärker. Durch die im Verhältnis geringere Eigenfluoreszenz des TNP-ATP ist es daher möglich die Anzahl der Bindungsstellen für TNP-ATP genauer zu bestimmen.

Bei Taanman et al. (1994) wurde dasselbe Meßverfahren, die Fluoreszenzspektroskopie, benutzt wie in dieser Arbeit, um die Anzahl der Bindungsstellen für TNP-ATP an COX zu ermitteln. Es gab jedoch zwei Unterschiede in den Meßbedingungen. Taanman et al. untersuchte die Bindung von TNP-ATP an COX aus zwei verschiedenen Hefestämmen und nicht an COX aus Rinderherz bzw. -leber. Auf eine gründliche Kalibrierung (siehe 3.1.2.) der Messdaten wurde von Taanman et al. verzichtet, stattdessen wurde die Differenz der Maximaextinktion

bei Messungen mit COX aus Wildtyp-Hefe und einer V1a-Deletionsmutante als Kalibrierung verwendet. Die Autoren nahmen an, daß der Hefemutante genau eine Bindungsstelle fehlte. Aufgrund dieser Annahme kamen die Autoren zu dem Schluß, daß zwei Moleküle TNP-ATP pro Molekül Wildtyp-COX binden. Das maximale Verhältnis zwischen der Extinktionsänderung bei Bindung von TNP-ATP an Wildtyp-COX und der bei Bindung von TNP-ATP an der Deletionsmutante ist 1.7 / 1 (siehe Figur 3 Taanman et al, 1994). Dies läßt, bei der Annahme, daß der Deletionsmutanten genau eine Bindungsstelle fehlt, sowohl den Schluß zu, daß Wildtyp-COX zwei Bindungsstellen (14% Fehler) als auch drei Bindungsstellen (15% Fehler). Letzteres deckt sich mit den in dieser Arbeit gemachten Messung.

Obwohl bekannt ist, daß sich die herzspezifische Regulation der Protonentranslokation der COX durch intraliposomale Nukleotide durch die Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Untereinheiten V1a-H, V1c aufheben läßt (Frank and Kadenbach, 1996), konnte keine Abnahme der Anzahl der Bindungsstellen nach Vorinkubation mit diesem Antikörper nachgewiesen werden (3.1.4). Dies läßt sich zum einen dadurch erklären, daß der Antikörper an eine andere Domäne der Untereinheit V1a-H bindet als das Nukleotid und lediglich nukleotidinduzierte, konformative Änderungen verhindert. Zum zweiten ist es auch möglich, daß das TNP-ATP nicht an die Untereinheit V1a-H bindet, da sowohl für das Leber- als auch das Herzenzym drei TNP-ATP Bindungsstellen pro Molekül COX gefunden worden. Die Untereinheit V1a ist eine der drei gewebsspezifischen Untereinheiten der COX. Rieger et al. (1995) konnten zeigen, daß die Anzahl der Bindungsstellen sich in COX aus Rinderherz und Rinderleber um eine unterscheiden. Die zusätzliche Bindungsstelle sollte an einer der drei herzspezifischen Untereinheiten der COX liegen.

Da alle verwendeten ATP-Derivate wie TNP-ATP, 2-N<sub>3</sub>-ATP oder 8-N<sub>3</sub>-ATP eine andere räumliche Struktur sowie eine andere Polarität besitzen als das ATP, ist es möglich, daß Untersuchungen mit ATP-Derivaten nicht zu korrekten Ergebnissen führen. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß zwar eine Kompetition der TNP-ATP Bindung durch ADP möglich ist (3.1.5.), jedoch unterscheiden sich die Dissoziationskonstanten für TNP-ATP und ADP erheblich.

Deshalb wurde die Bindung von ATP an COX aus Rinderherz durch Einsatz von radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S]ATP $\alpha$ S durchgeführt. Es wurden dabei zwei Meßverfahren verwendet.

Zum einen wurde eine Filtermethode benutzt, die es ermöglicht die Bindung von radioaktiv markierten Nukleotiden an der COX zu verfolgen (3.2.). Zum anderen wurde die Gleichgewichtsdialyse benutzt (siehe 3.3.3). Dieses Verfahren wurde bereits von Rieger (1995) zur Untersuchung der ATP-Bindungsstellen an



COX angewendet. Obwohl die Gleichgewichtsdialyse es im Gegensatz zur Filtermethode nicht erlaubt die Bindung von Nukleotiden zeitabhängig zu verfolgen, wurde diesem Verfahren der Vorzug gegeben, da es zu deutlich genaueren Meßergebnissen führte. Bei der Filtermethode wurde die im Filter verbliebene, unspezifische Menge Nukleotid indirekt ermittelt. Dies führte gerade bei hohen Nukleotidkonzentration zu sehr großen Schwankungen in den Meßergebnissen.

Die von Rieger ermittelte Anzahl von 7 ATP-Bindungsstellen pro Molekül COX aus Rinderherz konnte mit beiden Verfahren in dieser Arbeit bestätigt werden (Tabelle 6). Geringe Unterschiede in der mittleren Affinität der Bindungsstellen dürften durch den Einsatz verschiedener Puffersysteme mit unterschiedlichen Ionenstärken begründet sein, da bekannt ist, daß COX durch die Ionenstärke beeinflusst wird (Büge and Kadenbach, 1986, Reimann et al., 1988).

Neben der unterschiedlichen Anzahl der Bindungsstellen für TNP-ATP und ATP an COX aus Rinderherz ergab auch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten für diese Reagenzien, daß eine einfache Übertragung der Ergebnisse, die mit ATP-Derivaten erhalten wurden, auf ATP nicht möglich ist. Während für TNP-ATP die Dissoziationskonstanten von  $K_{d1,2} = 0,2 \mu\text{M}$  sowie  $K_{d3} = 0,94 \mu\text{M}$  ermittelt wurden, ist die mittlere Dissoziationskonstante für ATP mit  $K_d = 12,5 \mu\text{M}$  beträchtlich höher (Tabelle 6). Auch bei der Untersuchung der ATP-Bindungsstellen an COX bestätigte sich, die bereits bei der Bestimmung von Nukleotidsbindungsstellen anderer Proteinen erhaltene Erkenntnis, daß TNP-ATP in der Regel mit einer höheren Affinität als ATP an Proteine gebunden wird (Nakamoto and Inesi, 1984, Hiratsuka, 1985).

Durch den Einsatz einer Filtermethode (siehe 3.2.1.) zur Bestimmung der ATP-Bindungsstellen an COX konnte, neben der Bestätigung der Anzahl von 7 ATP-Bindungsstellen, gezeigt werden, daß die Bindung von ATP an isolierter COX zeitabhängig ist (Figur 13).

Um zu zeigen, ob die ATP-Bindungsstellen der COX auch ADP binden können, wurde sowohl mit der Gleichgewichtsdialyse als auch mit der Filtermethode die Bindung von radioaktiv markiertem [ $^{35}\text{S}$ ]ADP $\alpha\text{S}$  untersucht. Dabei stellte sich überraschenderweise heraus, daß pro Molekül COX aus Rinderherz 10 Moleküle ADP gebunden werden (Tabelle 6). Durch Kompetitionsversuche konnte gezeigt werden, daß alle ATP-Bindungsstellen sowohl ATP als auch ADP binden können (Figur 20). Zusätzlich gibt es noch drei Bindungsstellen, die spezifisch für ADP sind (Figur 22).

Bei allen bisher bekannten Effekten, bei denen ATP und ADP einen Einfluß auf die COX haben, wurde gezeigt, daß bereits wenig ADP ausreicht, um eine maximale Wirkung zu erreichen. Dies betrifft die Beeinflussung der

Protonenpumpe durch intraliposomale Nukleotide (Frank and Kadenbach, 1996), ebenso wie durch extraliposomale Nukleotide (Frank, 1997). Auch die Wirkung auf die Aktivität des löslichen Enzyms wird bereits durch kleine Anteile ADP ausgelöst (siehe 3.6.2.). Diese Experimente lassen den Schluß zu, daß ADP mit einer höheren Affinität an COX gebunden wird als ATP. Die Auswertung der Daten der Gleichgewichtsdialyse können diese Überlegung jedoch nicht bestätigen, sondern widersprechen ihr. Für ATP wurde eine mittlere Dissoziationskonstante von  $K_d = 12.5 \mu\text{M}$  gefunden, während hingegen für ADP eine mittlere Dissoziationskonstante von  $K_d = 28.5 \mu\text{M}$  ermittelt wurde. Diese Diskrepanz läßt sich auf zwei Arten erklären. Zum einen ist es möglich, daß die ADP-spezifischen Bindungsstellen eine niedrigere Affinität für ADP haben als die anderen Bindungsstellen, die beide Nukleotide binden und so den Wert für die mittlere Dissoziationskonstante erhöhen. Zum zweiten ist es möglich, daß durch die Bindung von ADP an die spezifischen Bindungsstellen die Affinitäten für die anderen ATP und ADP bindenden Bindungsmotive erniedrigt werden. Dieser Effekt würde bei der Bestimmung der mittleren Dissoziationskonstanten für ADP zum Tragen kommen, während er bei der Bestimmung der Affinität der Bindung von ATP keine Rolle spielt, da hier kein ADP zugegen ist. Für diese Überlegung spricht, daß die Bindung von radioaktivem ATP in Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  ADP stärker unterdrückt wird als die Bindung von radioaktivem ADP bei Anwesenheit von  $100 \mu\text{M}$  ATP (Figur 19 und Figur 21).

Die Anzahl von 10 ADP-Bindungsstellen wird indirekt durch die bei der Isolierung der COX aus Rinderherz gebundene Menge Cholat bestätigt. Durch Verwendung von radioaktiv markiertem Cholat konnte durch Yoshikawa und Mitarbeiter gezeigt werden, daß isolierungsbedingt 10 Moleküle Cholat an der COX gebunden werden (Napiwotzki et al., 1997). Cholat ähnelt in der räumlichen Struktur sowie der Gestalt der Elektronenhülle sehr dem ADP, so daß es durchaus möglich ist, daß das Cholat an dieselben Stellen des COX-Moleküls bindet, die auch ADP binden.

Die hohe Anzahl von 7 ATP- bzw. 10 ADP-Bindungsstellen am Rinderherzenzym bestätigen die Theorie, daß für eine Regulation der COX durch Nukleotide hauptsächlich die kernkodierte Untereinheiten zuständig sind (Kadenbach, 1986), da an COX aus *Paracoccus denitrificans* (2 UE) nur ein Molekül ATP pro Molekül COX bindet (Rieger et al., 1995). 6 der ATP-Bindungsstellen müssen demnach an Untereinheit III oder an den kernkodierte Untereinheiten lokalisiert sein, wohingegen die Lage der drei zusätzlichen ADP-Bindungsstellen ungeklärt ist.



## 4.2 Funktionelle Bedeutungen der Nukleotidbindungsstellen der COX

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der funktionelle Einfluß der Bindung von ADP und ATP auf die COX untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß sich das Absorptionsspektrum der COX in Gegenwart von ADP verändert, während die Anwesenheit von ATP keinerlei messbaren Einfluß auf das Spektrum hatte (Figur 24). Die Versuchsdaten zeigen, daß die für diesen Effekt verantwortliche Bindungsstelle nur ADP und nicht ATP bindet. Zusätzlich kann an dieses Bindungsmotiv auch IDP gebunden werden, jedoch mit einer deutlich niedrigeren Affinität (Figur 27). Es dürfte sich daher um eine der drei zusätzlichen ADP-Bindungsstellen handeln. Die Bindung von ADP an dieser Bindungsstelle ist zeitabhängig (Figur 26). Die Dissoziationskonstante  $K_d = 10 \mu\text{M}$  zeigt, daß bereits geringe Mengen an ADP in der Zelle ausreichen, um diese Bindungsstelle vollständig mit ADP zu besetzen. Diese Bindungsstelle könnte daher ein Indikator für das Enzym sein, der eine Erniedrigung des Energiegehalts der Zelle anzeigt.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Nukleotide eine Wirkung auf die Aktivität des löslichen Enzyms haben. Bereits 1976 konnte von Ferguson - Miller et al. gezeigt werden, daß die Aktivität von Keillin - Hartree - Partikeln durch Nukleotide beeinflusst werden kann. Diese Versuche auf das lösliche Enzym zu übertragen sind bisher gescheitert. Der Grund liegt wahrscheinlich in der Zeitabhängigkeit der Bindung des Nukleotids an isolierte, lösliche COX (3.6.3), die in früheren Untersuchungen nicht berücksichtigt wurde. Durch die Isolierung kommt es zu einer Bindung von Cholat an die Nukleotidbindungsstellen an der COX (Napiwotzki et al., 1997). Die Bindung des Cholats ist vermutlich für eine Veränderung der Konformation der COX verantwortlich, die eine Bindung von Nukleotiden erschwert. Bei allen in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß erst eine Inkubation von mindestens 24 h die vollständige Bindung von Nukleotiden an die COX ermöglicht. Nach dieser Vorinkubationszeit ist ein Austauschen von ATP und ADP innerhalb einer viel kürzeren Zeitspanne möglich. Dies ergab sich daraus, daß mit ATP vorinkubierte, solubilisierete COX sofort nach Zugabe von ADP eine erhöhte Atmungsrate zeigte (3.6.3.).

In Gegenwart von ATP wird die Aktivität des solubilisierten Enzyms gehemmt. Die dafür zuständige Bindungsstelle liegt an der Untereinheit IV der COX, da durch Zugabe eines für diese Untereinheit spezifischen Antikörpers diese Hemmung aufgehoben wurde. Auch bei Keillin - Hartree - Partikeln ist die Aktivität der COX in Gegenwart von ATP niedriger als bei Anwesenheit von ADP (Ferguson - Miller et al., 1976). Das an der Untereinheit IV des Rinderenzym

eine ATP-Bindungsstelle liegt, war bereits durch Photomarkierungsversuche mit 8-N<sub>3</sub>-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP und [<sup>35</sup>S]ATP $\alpha$ S bekannt (Hüther et al., 1988, Rieger, 1995). In dieser Arbeit konnte jedoch erstmals dieser ATP-Bindungsstelle eine funktionelle Bedeutung zugeordnet werden.

ATP hemmt gegenüber ADP nicht nur die Maximalgeschwindigkeit der Sauerstoffumsetzung, sondern beeinflusst zusätzlich die Michaelis-Menten-Konstanten des Cytochrom c. In Gegenwart von ATP sind diese mit  $K_{M1} = 1.1 \mu\text{M}$  und  $K_{M2} = 41 \mu\text{M}$  deutlich höher als bei Anwesenheit von ADP ( $K_{M1} = 0.07 \mu\text{M}$ ,  $K_{M2} = 23 \mu\text{M}$ ). Daß diese Erhöhung durch die Wirkung der Nukleotide auf die COX und nicht auf das Cytochrom c zurückzuführen ist, wird dadurch deutlich, daß der Antikörper gegen die Untereinheit IV der COX die Unterschiede in den Dissoziationskonstanten ebenso aufhebt wie die Unterschiede in der Maximalgeschwindigkeit. Dies dürfte bei einer alleinigen Wirkung der Nukleotide auf das Cytochrom c nicht der Fall sein, obwohl auch hierfür ein Einfluß von Nukleotiden bekannt ist (Margoliash et al., 1970, McIntosh et al., 1996).

Daß die Untereinheit IV an der Regulation der Aktivität der COX durch Beeinflussung der Cytochrom c Bindungsstelle beteiligt ist, war bereits durch Untersuchungen an Hefe bekannt. COX aus Hefe besitzt zwei Isoformen für die Untereinheit IV (Untereinheit Va und Vb in der Hefenomenklatur). Je nachdem welche Untereinheit im Hefeenzym vorhanden ist, verändert sich die Affinität der COX für Cytochrom c und die Atmungsrate (Allan et al., 1995). Im Unterschied zum Säugetier findet beim Hefeenzym die Regulation bereits auf genetischer Ebene statt und wird durch den Sauerstoffgehalt in der Zelle reguliert und nicht durch das Verhältnis von ATP und ADP (Poyton and Burke, 1992).

Der Einfluß der Nukleotide auf die Aktivität ist von der Wahl des verwendeten Detergenzes abhängig. So konnte eine Hemmung der Aktivität sowohl bei Verwendung von Tween 80 als auch von Tween 20 beobachtet werden, während in Gegenwart von Laurylmaltosid keinerlei Nukleotideffekte beobachtbar sind. Die Aufhebung der Wirkung von Nukleotiden auf die COX durch Laurylmaltosid konnte ebenfalls für die Änderung des Absorptionsspektrums beobachtet werden (siehe 3.5.4.). Laurylmaltosid ist bekannt dafür, daß es einen starken Einfluß auf die COX hat. So ist es in diesem Detergenz möglich die Untereinheit VIb des Rinderenzyms selektiv abzutrennen (Weishaupt and Kadenbach, 1992). Ebenso ist es möglich COX aus Rinderherz in Laurylmaltosid zu monomerisieren (Suarez et al., 1984). Diese Arbeiten zeigen, daß die Verwendung von Laurylmaltosid als Detergenz bei der Untersuchung von COX nicht unbedingt ratsam ist, da unter diesen Bedingungen die COX starken strukturellen Einflüssen unterliegt, die zu nicht physiologischen Ergebnissen führen können.

Obwohl die Aktivität des Enzyms abhängig ist vom verwendeten Puffersystem sowie von anwesenden Ionen und Ionenstärken (Figur 42 und Figur 43, sowie Büge and Kadenbach, 1986), läßt sich der Unterschied zwischen ATP- und ADP-inkubiertem Enzym in der Regel nicht aufheben. Dies ist unabhängig davon, ob die Aktivität oder das Absorptionsspektrum der COX bestimmt wurde. So ist zwar in Gegenwart von Magnesiumionen die Aktivität der COX deutlich niedriger als in Abwesenheit von Magnesiumionen oder in Gegenwart von EDTA (Figur 43), die Hemmung durch ATP läßt sich jedoch durch Magnesiumionen nicht unterdrücken. Bei Anwesenheit von Magnesiumionen wird der Aktivitätsunterschied zwischen ATP- und ADP- inkubierter COX sogar noch vergrößert. Die allgemein niedrigeren Atmungsraten in Anwesenheit von Magnesiumionen lassen sich durch eine Erniedrigung der Affinität der COX für Cytochrom c erklären. Diese kommt durch eine Beeinflussung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der COX und dem Cytochrom c durch zweiwertige Kationen zustande (Papa et al., 1987).

Im Gegensatz zur Wirkung der Nukleotide auf das Absorptionsspektrum konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die für die Hemmung der Aktivität am löslichen Enzym verantwortliche Bindungsstelle sowohl ATP als auch ADP binden kann. Dies zeigte sich daran, daß die Zeitabhängigkeit der Bindung von ADP durch Vorinkubation mit ATP verändert wird. Zeigte sich bei dem unbehandelten Enzym bei Zugabe von ADP keinerlei Einfluß auf die Aktivität der COX, so wurde bei Vorinkubation mit ATP die Atmungsrate des Enzyms nach Zugabe von ADP augenblicklich erhöht (Figur 40). Diese Daten deuten daraufhin, daß durch die Isolierung in Cholat die Umgebung der Nukleotidbindungsstellen verändert wird, so daß es bei Untersuchungen der Wirkung von Nukleotiden nötig ist das Enzym erst längere Zeit mit ATP oder ADP vorzuinkubieren. Für diese These spricht auch, daß die Veränderung des Absorptionsspektrums ebenso von der Inkubationszeit abhängig ist wie Beeinflussung der Aktivität der COX durch Nukleotide. Auch war eine sinnvolle Bestimmung der ATP-Bindungsstellen erst nach längerer Inkubationszeit möglich (Figur 13, Figur E16). Ist COX mit Nukleotiden vorinkubiert worden, so verschwindet diese Zeitabhängigkeit (Figur 41). Die Aufhebung dieses kryptischen Verhaltens ist auch dann gegeben, wenn COX mit Nukleotiden rekonstituiert wurde, da die Rekonstitution mindestens 22 h dauert. Selbst wenn exraliposomale Nukleotide nach der Rekonstitution durch Dialyse entfernt werden, ist eine Wirkung extraliposomaler Nukleotide augenblicklich zu beobachten (Figur 55 und Frank, 1997). Für dieses kryptische Verhalten, das vermutlich durch die Anwesenheit von Cholat bei der Isolierung ausgelöst wird, spricht auch, daß am isolierten Enzym 10 Moleküle Cholat pro Molekül COX gefunden werden (Napiwotzki et al., 1997). Diese gebundenen Cholatmoleküle lassen sich auch durch Waschen mit cholatfreien

Detergenzlösungen nicht entfernen. Ein isolierungsbedingtes kryptisches Verhalten der Nukleotidbindungsstellen ist auch am Entkopplerprotein aus braunem Fettgewebe gefunden worden (Huang and Klingenberg, 1995).

Ähnlich wie bei den spektralen Änderungen reichen bereits kleine Mengen ADP aus, um die halbmaximale Erhöhung der Atmungsrate zu beobachten (Figur 40). Die benötigten ADP - Mengen sind jedoch deutlich höher als die, die zu einer halbmaximalen Abnahme des Absorptionsspektrum führen. Bedenkt man zusätzlich, daß die Bindungsstelle, die die spektralen Änderungen verursacht, nur ADP und nicht ATP bindet, so ergibt sich, daß es sich hierbei um zwei verschiedene, unabhängige Bindungsstellen an der COX handelt.

Zur genaueren Bestimmung der Lage der Bindungsstelle an der Untereinheit IV wurden Versuche am rekonstituierten Enzym durchgeführt. Dabei zeigte sich im Gegensatz zum löslichen Enzym keine Beeinflussung der maximalen Atmungsrate durch ATP oder ADP, obwohl eine Erniedrigung der Affinität der COX für Cytochrom c durch äußeres ATP gegenüber rekonstituierter COX, die mit extraliposomalem ADP inkubiert wurde, zu beobachten war (Figur 55). Dies deutet daraufhin, daß beim rekonstituierten Enzym ein zusätzlicher Effekt die Atmungsrate beeinflusst, der beim löslichen Enzym keine Rolle spielt. Hierbei könnte es sich beispielsweise um das Membranpotential oder den Protonengradienten handeln. Die Unterschiede der Affinität für Cytochrom c beim rekonstituierten Enzym waren nur abhängig vom äußeren Nukleotid und wurden bei Zugabe des Antikörpers gegen die Untereinheit IV aufgehoben. Da nur äußere Nukleotide eine Wirkung auf die Affinität der COX für Cytochrom c zeigen, sollte die Nukleotidbindungsstelle auf der zum Cytosol gerichteten Seite der Untereinheit IV des Enzyms liegen. Dies wird durch Photomarkierungsversuche, die am rekonstituierten Enzym durchgeführt wurden, unterstützt (Reimann et al., 1988). Dort wurden am rekonstituierten Enzym mit 8-N<sub>3</sub>-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP die Untereinheiten II/III, IV, VIIabc/VIII markiert. Das Fehlen einer Hemmung der Atmungsrate von rekonstituierter COX durch ATP gegenüber der löslichen COX kann dadurch erklärt werden, daß bei rekonstituierter COX die Nukleotidmenge auf die Atmungsrate einen Einfluß hat. Hüther et al. (1988) konnten zeigen, daß die Aktivität rekonstituierter COX in Gegenwart geringer Nukleotidkonzentration durch ADP etwas stärker gehemmt wird als durch ATP. Bei hohen Nukleotidkonzentrationen hemmt jedoch ATP deutlich stärker als ADP. Bei einer Nukleotidkonzentration von 5 - 6 mM ist die Hemmung durch beide Nukleotide gleich stark. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden in der Regel mit einer Gesamtnukleotid-konzentration von 5 mM durchgeführt, so daß ein Unterschied in der Aktivität der mit ATP oder ADP inkubierten Vesikel nicht zu erwarten war.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wurde versucht die Wirkung von Nukleotiden auf die Atmungsrate von COX in solubilisierten Mitochondrien zu übertragen (Arnold and Kadenbach, 1997). Es konnte gezeigt werden, das an solubilisierten Mitochondrien die Aktivität in Gegenwart von ATP ebenso erniedrigt ist wie in dieser Arbeit am gelösten Rinderherzenzym gezeigt wurde. Zusätzlich konnte in Gegenwart von Pyruvatkinase (PK) und Phosphoenolpyruvat (PEP), einem ATP regenerierendem System, gezeigt werden, daß in Gegenwart von ATP die Atmungsrate, die in Abhängigkeit von der Cytochrom c Konzentration bestimmt wurde, einen sigmoidalen Verlauf nahm. Dies deutet auf eine allosterische Beziehung der beiden Dimere der COX hin. Im Gegensatz zu der Hemmung der Aktivität durch ATP am löslichen Enzym, ließ sich diese Kooperativität in Gegenwart von TMPD nicht nachweisen, so daß es sich dabei um unterschiedliche Bindungsstellen für Nukleotide handeln sollte.

Frank und Kadenbach (1996) haben gezeigt, daß auf der matrixorientierten Seite der Untereinheit VIa-H der COX aus Rinderherz eine Nukleotidbindungsstelle liegt, die die  $H^+/e^-$ -Stöchiometrie des Enzyms beeinflusst. In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß auch extraliposomale Nukleotide die  $H^+/e^-$ -Stöchiometrie beeinflussen (Frank 1997). Beide Effekte lassen sich durch Inkubation mit einem Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc der COX unterdrücken. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Atmungsrate und  $H^+/e^-$ -Stöchiometrie zu finden, wurde die Wirkung des Antikörpers gegen die Untereinheiten VIa-H, VIc auf die Atmungsrate rekonstituierter COX bei gleichzeitiger Anwesenheit intraliposomaler und extraliposomaler Nukleotide bestimmt. Neben einer allgemeinen Erhöhung der Aktivität in Gegenwart des Antikörpers zeigte sich, das intraliposomales ATP bei gleichzeitiger Anwesenheit von extraliposomalen ADP die Atmungsrate deutlich erhöhte (Figur 57).

Um zu sehen, ob der Effekt der Nukleotide auf die Atmungsrate durch die herzspezifische Isoform der Untereinheit VIa verursacht wird oder durch die Untereinheit VIc, an die der Antikörper ebenfalls bindet (Schneyder et al., 1991) wurde die Wirkung der Nukleotide in Gegenwart des Antikörpers am Rindernierenenzym untersucht. Dieses Enzym enthält nicht die Herzisoform sondern die Leberisoform der Untereinheit VIa. Der Antikörper bindet jedoch nur an die herzspezifische Isoform der Untereinheit VIa. Die Versuche zeigten, daß zwar auch beim Nierenenzym eine generelle Erhöhung der Aktivität zu beobachten ist, aber es fand keine zusätzliche Stimulierung der Atmungsrate in Gegenwart von intraliposomalen ATP und extraliposomalen ADP statt (Figur 58). Diese Beobachtungen lassen zwei Schlüsse zu. An der zusätzlichen Stimulierung der Atmungsrate durch den Antikörper in Gegenwart von intraliposomalen ATP und extraliposomalen ADP ist die Herzisoform der Untereinheit VIa beteiligt. Da

der Antikörper gegen die Untereinheiten V1a-H, V1c auch bei der Leberform der COX eine generelle Stimulierung der Atmungsrate bewirkt, sobald der Antikörper extraliposomal zugegeben wird, heißt das, daß der Antikörper an die cytosolische Domäne der Untereinheit V1c bindet. Dies könnte bedeuten, daß die Untereinheit V1c die Aktivität des Enzyms generell erniedrigt.

Im Gegensatz zur  $H^+/e^-$ -Stöchiometrie, wo es zur Hemmung ausreicht, wenn entweder intraliposomal ATP oder extraliposomal ADP vorhanden ist (Frank, 1997), wurde die zusätzliche Stimulierung nur in dem Fall beobachtet, wenn sowohl intraliposomal ATP und extraliposomal ADP zugegen waren. Die Beeinflussung der Aktivität der Rinderherz-COX durch den Antikörper wurde unabhängig davon beobachtet, ob der Antikörper sowohl intra- und extraliposomal oder ob der Antikörper nur extraliposomal vorhanden gewesen ist. Dies läßt den Schluß zu, daß der Antikörper auch auf der cytosolischen Seite bindet. Da für der Hemmung der Protonentranslokation der COX die Bindung von intraliposomalen ATP oder extraliposomalen ADP ausreicht, während die Stimulierung der Atmungsrate in Gegenwart des Antikörpers V1a-H,V1c nur auftritt, wenn sowohl intraliposomales ATP und extraliposomales ADP vorliegen, kann ein direkter Zusammenhang zwischen der Regulation von Protonentranslokation und Enzymaktivität ausgeschlossen werden. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß je nach Bedarf Protonentranslokation und Atmungsrate getrennt voneinander reguliert werden können, obwohl die Experimente mit Rindernieren-COX es wahrscheinlich machen, daß die Untereinheit V1a-H auch bei der Regulation der Atmungsrate eine Funktion hat.

Sowohl bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Regulation der Aktivität der COX durch Nukleotide als auch in Versuchen zur Regulation der  $H^+/e^-$ -Stöchiometrie durch intraliposomale und extraliposomale Nukleotide (Frank and Kadenbach, 1996, Frank, 1997) wurde eine Stimulierung oder Hemmung bei hohen ATP/ADP - Verhältnissen beobachtet. In allen Fällen trat eine Regulierung erst bei ATP - Anteilen von deutlich mehr als 95 % auf. Bei in vivo durchgeführten Bestimmungen des ATP/ADP - Verhältnisses in Rattenleberzellen wurde jedoch ein kleinerer ATP - Anteil ermittelt. So beträgt der ATP - Anteil im Cytosol 86 % und in den Mitochondrien gar nur 50 % (Schwenke et al., 1981), so daß eine Regulation bei hohen ATP/ADP - Verhältnissen physiologisch unsinnig erscheint. Diese Messungen haben jedoch sämtliche Nukleotide in den Zellen bestimmt. Für die Regulation durch Nukleotide ist jedoch das Verhältnis der freien Nukleotide relevant. Dies dürfte aufgrund der großen Zahl gebundener ADP - Moleküle zu höheren ATP/ADP - Verhältnissen verschoben sein (Veech et al., 1979), so daß eine Regulation bei ATP - Anteilen von mehr als 95 % sinnvoll erscheint.

### **4.3 Lage der Nukleotidbindungsstellen**

Durch die verschiedenen Untersuchungen dieser Arbeit zur Anzahl und Funktion der Nukleotidbindungsstellen sowie durch bereits in der Literatur beschriebene Versuche (Tabelle 13) ist es möglich einen Teil der Nukleotidbindungsstellen der COX genauer zu lokalisieren.

Taanman et al. (1994) zeigten, daß es auf der Untereinheit VIa der Rinder-COX eine ATP-Bindungsstelle gibt, die sowohl auf der Herzisoform als auch auf der Leberisoform der VIa zu finden ist. Aufgrund des hohen Grades an Konservierung der Aminosäuresequenz in dem Bereich von AS 63 - 68 der Rinderherzuntereinheit (Ewart et al., 1991) sowie der Homologie dieses Sequenzabschnitts mit dem Bindungsmotiv nukleotidbindender Proteine (Walker et al., 1982) kommen Taanman et al. zu dem Schluß, daß auf der cytosolischen Seite der Untereinheit VIa eine ATP-Bindungsstelle lokalisiert sein muß. Dies wird durch die theoretischen Überlegungen in dieser Arbeit unterstützt (Figur 64).

Frank und Kadenbach (1996) zeigten, daß die Untereinheit VIa-H aus Rinderherz noch eine zusätzliche zur Maxtrixseite orientierte Bindungsstelle besitzt. Dabei muß es sich um ein sowohl ATP als auch ADP erkennendes Motiv handeln, da ATP die  $H^+/e^-$ -Stöchiometrie verringert und alle ATP-Bindungsstellen auch ADP erkennen (Figur 23). Das Vorhandensein einer Bindungsstelle auf dem N-terminalen Ende der Untereinheit VIa-H wird durch die theoretischen Überlegungen in dieser Arbeit (Figur 63) sowie von Tsukihara et al. (1996) unterstützt. Tsukihara et al. haben ein Cholatmolekül an dem N-terminalen Ende der Untereinheit VIa in der Kristallstruktur identifiziert. Das Cholatmolekül ähnelt sowohl von der räumlichen Struktur als auch von der Elektronenhülle dem ADP, so daß die Autoren hier eine mögliche ADP-Bindungsstelle postulieren.

**Tabelle 13:** Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Arbeiten zur Bestimmung der Anzahl und Lage von Adenosinnukleotidbindungsstellen an der COX. n. b. = nicht bestimmt

Anzahl der Bindungsstellen	untersuchte Spezies	Nukleotid	Verfahren	Lage der Bindungsstellen	Literatur
n. b.	Rinderherz	8-N <sub>3</sub> -[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	Photolabelling	IV, VIIabc/VIII	Montecucco et al., 1986
n.b.	Rinderherz	[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	Photolabelling	IV, VII	Bisson et al., 1987
n. b.	Rinderherz	2-N <sub>3</sub> -ADP	Photolabelling	II/III, IV, Vb, VIa, VIb, VIIb	Hüther, 1987
n. b.	Rinderherz (rekonstituiert)	8-N <sub>3</sub> -[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	Photolabelling	II/III, IV, VIIabc	Reimann et al., 1988
n. b.	Rinderherz	8-N <sub>3</sub> -[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	Photolabelling	II/III, IV, Vab, VIa, VIbc, VIIabc	Hüther et al., 1988
2	Rinderherz	TNP-ATP	Photometrie	n. b.	Reimann and Kadenbach, 1992
n. b.	Rinderherz, Rinderniere	2-N <sub>3</sub> -[ $\beta$ , $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	Photolabelling	VIa (cytosolisch)	Taanman et al., 1994
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Wildtyp und $\Delta$ VIa - Mutante)	TNP-ATP	Fluoreszenz-photometrie	VIa + x	Taanman et al., 1994
1	<i>Paracoccus denitrificans</i> (2UE)	[ <sup>35</sup> S]ATP $\alpha$ S	Gleichgewichts dialyse	n. b.	Rieger et al., 1995
7	Rinderherz	[ <sup>35</sup> S]ATP $\alpha$ S	Gleichgewichts dialyse	n. b.	Rieger et al., 1995
6	Rinderleber	[ <sup>35</sup> S]ATP $\alpha$ S	Gleichgewichts dialyse	n. b.	Rieger et al., 1995
n. b.	Rinderherz	[ <sup>32</sup> P]ATP $\gamma$ P + 8-N <sub>3</sub> -ATP + ATP	Photolabelling	II/III, IV, Vab, VIa, VIbc, VIIa, VIIbc	Rieger et al., 1995
3	Rinderherz	TNP-ATP	Fluoreszenz-photometrie	n. b.	Rieger et al., 1995 siehe 3.1.2.
3	Rinderleber	TNP-ATP	Fluoreszenz-photometrie	n. b.	Rieger et al., 1995 siehe 3.1.2.
1	<i>Paracoccus denitrificans</i> (2UE)	TNP-ATP	Fluoreszenz-photometrie	n. b.	Rieger et al., 1995 siehe 3.1.2.
n. b.	Rinderleber	[ <sup>35</sup> S]ATP $\alpha$ S	Photolabelling	IV, Vab, VIIabc	Rieger, 1995



n. b.	Rinderherz	[ <sup>35</sup> S]ATP $\alpha$ S	Photolabelling	IV, Vab, VIIabc	Rieger, 1995
n. b.	Rinderherz	ATP + ADP	H <sup>+</sup> /e <sup>-</sup> - Stöchiometrie- messung + Antikörper	Vla-H (Matrix)	Frank and Kadenbach, 1996
7	Rinderherz	Adenosin-5'- triphosphopyrid oxal	Photometrie	n. b.	Bender, 1996
7	Rinderherz	ATP	Filtermethode, Gleichgewichts dialyse	n. b.	Napiwotzki et al., 1997 siehe 3.2.1. und 3.3.3.
10	Rinderherz	ADP	Filtermethode, Gleichgewichts dialyse	n. b.	Napiwotzki et al., 1997 siehe 3.2.2. und 3.3.3.
n. b.	Rinderherz	ATP + ADP	Aktivitäts- messung + Antikörper	IV	Napiwotzki et al., 1997 siehe 3.6.6.
n. b.	Thunfischherz	ATP + PEP + PK, ADP	Aktivitäts- messung + Antikörper	IV (Matrix)	Arnold et al., 1997
n. b.	Rinderherz, Rinderleber	ATP + ADP	H <sup>+</sup> /e <sup>-</sup> - Stöchiometrie- messung + Antikörper	Vlac (cytosolisch)	Frank, 1997
n. b.	Rinderherz, Rinderleber	ATP + ADP	Aktivitäts- messung + Antikörper	IV (cytosolisch)	siehe 3.7.2
n. b.	Rinderherz	ATP + ADP	Aktivitäts- messung + Antikörper	Vlac (cytosolisch)	siehe 3.7.3

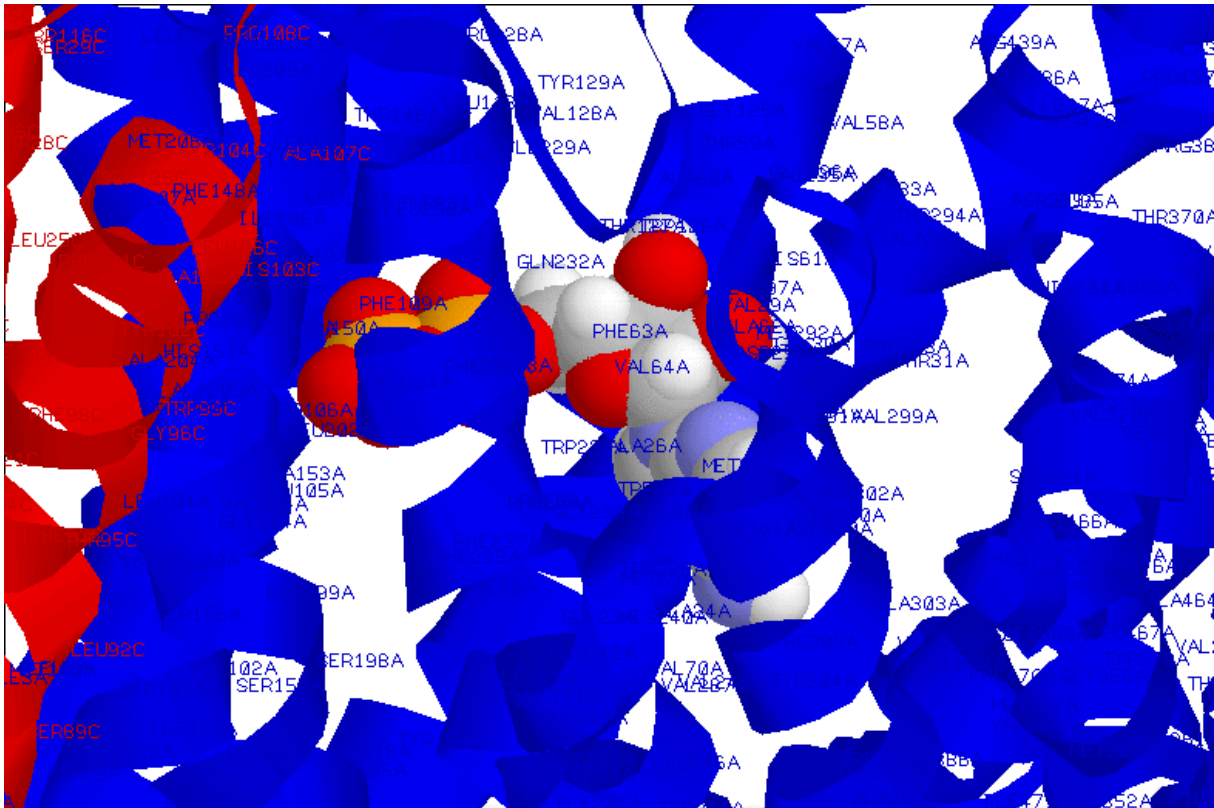
Die Untersuchungen am löslichen Enzym in dieser Arbeit lassen auf eine Nukleotidbindungsstelle an der Untereinheit IV der COX schließen (siehe 3.6.6.). Dies wird durch Photomarkierungsexperimente bestätigt, bei denen sowohl eine Bindung von 8-N<sub>3</sub>-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP als auch von [<sup>35</sup>S]ATP $\alpha$ S gefunden wurde (Montecucco et al., 1986, Rieger, 1995). Durch die Versuche am rekonstituierten Enzym (siehe 3.7.2.) konnte die Lage der Bindungsstelle auf den cytosolischen Bereich der Untereinheit IV eingegrenzt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus Photomarkierungsexperimenten am rekonstituierten Enzym, in denen eine Bindung von 8-N<sub>3</sub>-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP auf der cytosolischen Seite der Untereinheit IV nachgewiesen werden konnte (Reimann et al., 1988). Die softwareunterstützte Auswertung von Bindungsmotiven zeigt eine mögliche

Bindungsstelle im cytosolischen Bereich der Untereinheit IV (AS 130 - 135). Dieses Bindungsmotiv liegt in der Nähe der Untereinheit II, auf der die Cytochrom c Bindungsstelle lokalisiert ist (Figur 61). Es wäre daher eine Beeinflussung der Affinität der COX für Cytochrom c durch gebundenes Nukleotid denkbar.

Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine mögliche Nukleotidbindungsstelle auf der Matrixseite der Untereinheit IV (Arnold and Kadebach, 1997). In dieser Arbeit konnte an submitochondrialen Partikeln gezeigt werden, daß in Gegenwart von intraliposomalen PEP, PK und ATP die Aktivitätskurve in Abhängigkeit von der Cytochrom c Konzentration einen sigmoidalen Verlauf nimmt. Durch Zugabe eines Antikörpers gegen die Untereinheit IV wurde die Bindungsstelle auf der cytosolischen Seite der Untereinheit IV der COX lokalisiert.

In allen Photomarkierungsversuchen, die am löslichen Enzym durchgeführt wurden, war eine Markierung der Untereinheiten Vab auf dem SDS-PAGE sichtbar (Hüther et al., 1988, Rieger et al., 1995, Rieger 1995). Die Auswertung der Bindungsmotive macht eine Bindung von Nukleotiden an der Untereinheit Vb wahrscheinlicher als an der Untereinheit Va (Figur 62).

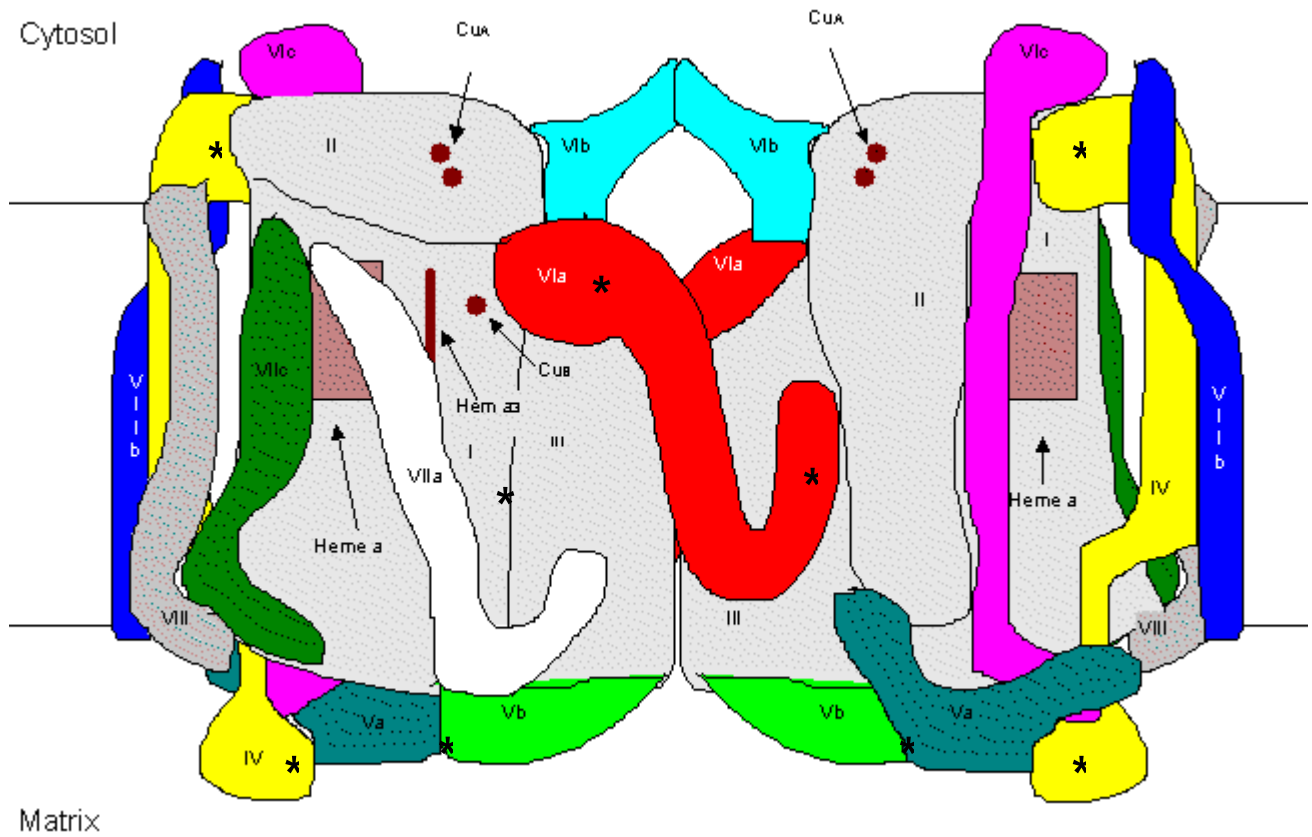
Mindestens eine der ATP-Bindungsstellen sollte auf einer der mitochondrial kodierten Untereinheiten I - III lokalisiert sein. Dies folgt aus verschiedenen Photomarkierungsversuchen, in denen die Untereinheiten II / III im SDS-PAGE mit verschiedenen ATP-Derivaten markiert waren (Reimann et al., 1988, Hüther et al., 1988, Rieger et al., 1995). Reimann et al. konnten dabei zeigen, daß die Nukleotidbindungsstelle auf der cytosolischen Seite der Untereinheiten II oder III der COX sein muß, da auch am rekonstituierten Enzym eine Bindung an eine dieser Untereinheiten gefunden werden konnte. Tsukihara et al. konnten eines der 10 Cholatmoleküle, die am isolierten Enzym gebunden sind, in den Strukturdaten der COX zwischen den Untereinheiten I und III identifizieren (Figur 65).



**Figur 65:** ADP-Bindungsstelle zwischen der Untereinheit I und III der COX aus Rinderherz. Der optische Fit wurde nach den Daten von Tsukihara et al., (1996) angefertigt. Rot: Untereinheit III, blau: Untereinheit I, mehrfarbig: ADP-Molekül. Für die Bindung nichtrelevante Gebiete der COX sind ausgeblendet.

Im scheinbaren Gegensatz zu diesen Daten steht die Erkenntnis, daß COX aus *Paracoccus denitrificans*, das isolierungsbedingt nur 2 Untereinheiten enthielt, ebenfalls eine Nukleotidbindungsstelle enthält. Diese Bindungsstelle wurde sowohl mit [ $^{35}$ S]ATP $\alpha$ S unter Verwendung der Gleichgewichtsdialyse gefunden als auch durch fluorezenzphotometrische Untersuchungen, bei denen TNP-ATP als ATP-Analogon verwendet wurde (siehe 3.1.2 und Rieger et al., 1995). Diese Diskrepanz läßt sich dadurch erklären, das ein Großteil der Bindungsdomäne auf der Untereinheit I lokalisiert ist. Dieser Teil sollte mit großer Homologie auch beim *Paracoccus* - Enzym vorkommen. Die Bindung der ATP-Derivate beim Photolabelling könnte jedoch an eine Aminosäure der Untereinheit III geschehen, so daß bei der Auftrennung auf dem SDS-PAGE die Bande der Untereinheiten II und III markiert ist.

Die Lage der einzelnen Nukleotidbindungsstellen ist, soweit bekannt, in einem Schema des dimeren Rinderherzenzym angegeben (Figur 66).



**Figur 66:** Schema der dimeren COX aus Rinderherz, basierend auf der Kristallstruktur des Enzyms (Tsukihara et al., 1996). Die postulierten ATP/ADP - Bindungsstellen sind durch Sterne markiert.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Anzahl der Nukleotidbindungsstellen der COX aus Rinderherz bestimmt. Durch Fluoreszenzphotometrie konnte gezeigt werden, dass sowohl an COX aus Rinderherz wie aus Rinderleber 3 Moleküle TNP-ATP pro Molekül COX binden. Die Affinitäten der Bindungsstellen waren dabei  $K_d1,2 = 0.2 \mu\text{M}$  und  $K_d3 = 0.9 \mu\text{M}$ . Im Gegensatz dazu wurde für das Enzym des Prokaryoten *Paracoccus denitrificans* nur eine Bindungsstelle für TNP-ATP nachgewiesen. Durch einen Wettbewerbsversuch mit ADP wurde eine Austauschbarkeit des TNP-ATP durch ADP festgestellt.

Durch zwei unabhängige Methoden konnte die Beobachtung von Rieger et al. (1995), daß COX aus Rinderherz 7 ATP-Bindungsstellen besitzt, bestätigt werden. Zusätzlich wurden durch diese Methoden 10 ADP - Bindungsstellen an der COX gefunden. Die mittlere Affinität der ATP-Bindungsstellen ist  $K_d = 12.5 \mu\text{M}$ , während dieser Wert für die ADP-Bindung  $K_d = 28.5 \mu\text{M}$  ist. Durch Wettbewerbsversuche konnte nachgewiesen werden, dass alle ATP-Bindungsstellen auch ADP binden können. Dies bedeutet, daß COX aus Rinderherz 7 Adenosinnukleotid- und 3 ADP-Bindungsstellen hat. Obwohl der apparente  $K_d$  von ADP höher ist als von ATP, wurde in den Wettbewerbsversuchen bei niedrigeren Konkurrentkonzentrationen ein größerer Austausch an ATP durch ADP beobachtet als umgekehrt. Dies könnte an den drei zusätzlichen ADP-Bindungsmotiven liegen, die eventuell die Affinität der ATP und ADP bindenden Domänen der COX beeinflussen.

Durch polarografische Untersuchungen der Aktivität löslicher und rekonstituierter COX konnte eine Beeinflussung der Atmungsrate durch Nukleotide nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß ATP für eine Hemmung der Aktivität am löslichen Enzym und für eine Erniedrigung der Affinität der COX für Cytochrom c sowohl am löslichen als auch am rekonstituierten Enzym sorgte. Durch Inkubation mit einem Antikörper gegen die Untereinheit IV wurde die Lage der für diese Effekte verantwortlichen Bindungsstelle auf die cytosolische Seite der Untereinheit IV lokalisiert.

Durch photometrische Untersuchungen konnte eine Wirkung von ADP auf die Hämzentren der COX nachgewiesen werden. Diese Wirkung wurde spezifisch von ADP und in geringerem Maße von IDP erzeugt, während alle anderen Nukleotide, auch ATP, keinen Effekt auf die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Bande im Absorptionsspektrum der COX haben. Die Beeinflussung des Spektrums durch ADP ist unabhängig vom Reduktionsgrad des Enzyms beobachtbar, jedoch ist die Wirkung an oxidiertem COX größer als an reduzierter. Die Wirkung von ADP auf die Hämzentren war durch Vorinkubation mit Antikörpern gegen die Untereinheiten IV oder VIa, VIc nicht beeinflussbar.

Die Wirkung der Nukleotide am löslichen Enzym auf die Absorptionsbande ebenso wie auf die Aktivität ist abhängig vom Detergenz und von der Ionenstärke. Während in Tween 20 und Tween 80 beide Effekte beobachtet werden konnten, ist in Gegenwart von Laurylmaltosid keinerlei Unterschied zwischen ATP- und ADP-inkubierter COX zu beobachten. In Tween 20, im Gegensatz zu Tween 80, ließ sich die Wirkung von ADP auf das Absorptionsspektrum durch hohe Ionenstärken aufheben.

Sowohl bei der Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen der COX, der Beeinflussung der Aktivität durch Nukleotide als auch der Wirkung von ADP auf das Absorptionsspektrum konnte gezeigt werden, daß die vollständige Bindung der Nukleotide erst nach einer Inkubationszeit von mehreren Stunden zu beobachten war. Durch einen Wettbewerbsversuch an löslicher COX konnte nachgewiesen werden, daß dieses zeitabhängige Verhalten nach der ersten Inkubation verschwindet und daher durch die Isolierung bedingt ist.

## 6 Literatur

Allan, L.A., Zhao, X.-J., Caughey, W. and Poyton, R.O. (1995).

Isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V affect the binuclear reaction center and alter the kinetics of interaction with the isoforms of yeast cytochrome c.

*J. Biol. Chem.*, **270**, 110 - 118.

Anthony, G., Reimann, A. and Kadenbach, B. (1993).

Tissue - specific regulation of bovine heart cytochrome c oxidase by ATP via interaction with subunit VIa.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1652 - 1656.

Arai, M., Pink, S. and Forgac, M. (1989).

Interactions of anions and ADP with the coated vesicle proton pump.

*Biochemistry*, **28**, 3075 - 3082.

Arnold, S., Lee, I., Kim, M.J., Song, E., Linder, D. and Kadenbach, B. (1997).

The subunit structure of cytochrome c oxidase from tuna heart and liver.

*Eur. J. Biochem.* **248**, 99 - 103.

Arnold, S. and Kadenbach, B. (1997).

Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome c oxidase.

*Eur. J. Biochem.*, in press

Bender, E. (1996).

Nachweis von Nukleotidbindungsstellen an der Cytochrom c Oxidase durch Adenosinphosphopyridoxal.

*Diplomarbeit, FB Chemie, Phillips - Universität Marburg.*

Bisson, R., Schiavo, G. and Montecucco, C. (1987).

ATP induces conformational changes in mitochondrial cytochrome c oxidase.

*J. Biol. Chem.*, **262**, 5992 - 5998.

- Blenkinsop, C., Aitken, A.E. and Wilson, M.T. (1996).  
Physical and functional characterisation of monomeric and dimeric cytochrome c oxidases.  
*Comp. Biochem. Physiol.*, **115B**, 421 - 428.
- Bradford, M. (1976).  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
*Anal. Biochem.*, **72**, 248 - 254.
- Brooks, S.P.J. and Nicholls, P. (1982).  
Anion and ionic strength effects upon the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **680**, 33 - 43.
- Brown, W.M., Prager, E. M. and Wilson, A.C. (1982).  
*J. Mol. Evol.*, **17**, 197 - 213.
- Büge, U. and Kadenbach, B. (1986).  
Influence of buffer composition, membrane lipids and proteases on the kinetics of reconstituted cytochrome c oxidase from bovine liver and heart.  
*Eur. J. Biochem.*, **161**, 383 - 390.
- Capaldi, R.A. (1990).  
Structure and function of cytochrome c oxidase.  
*Annu. R. Biochem.*, **59**, 569 - 596.
- Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E., Villiani, G. and Papa, S. (1991).  
 $H^+/e^-$  stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes.  
*FEBS lett.*, **208**, 179 - 182.
- Capitanio, N., Peccarisi, R., Capitanio, G., Villani, G., De Nitto, E., Scacco, S. and Papa, S. (1994).  
Role of nuclear-encoded subunits of mitochondrial cytochrome c oxidase in proton pumping by limited enzymatic proteolysis.  
*Biochemistry*, **33**, 12521 - 12526.



Carroll, R.C. and Racker, E. (1977).

Preparation and characterization of cytochrome c oxidase vesicles with high respiratory control.

*J. Biol. Chem.*, **252**, 6981 - 6990.

Casey, R.P., Chappell, J.B. and Azzi, A. (1979).

Limited - turnover studies on proton translocation in reconstituted cytochrome c oxidase - containing vesicles.

*Biochem. J.*, **182**, 149 - 156.

Casey, R.P., Thelen, M. and Azzi, A. (1979b)

Dicyclohexylcarbodiimide inhibits proton translocation by cytochrome c oxidase.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 1044 - 1051.

Darley - Usmar, V.M., Alizai, N., Al - Ayash, A.I., Jones, G.D., Sharpe, A. and Wilson, M.T. (1981).

A comparison of the structural and functional properties of cytochrome c oxidase isolated from beef (*Bos tauros*), camel (*Camelus dromedarius*), chicken (*Gallus domesticus*) and rat (*rattus norvegicus*).

*Comp. Biochem. Physiol.*, **68 B**, 445 - 456.

Dunkel, R. (1993).

Die Bindung von Progesteron an Uteroglobulin: Expression und Charakterisierung rekombinanter Uteroglobulinvarianten.

*Dissertation, FB Chemie, Philipps-Universität-Marburg.*

Edel. C.M., Hartog, A.F. and Berden, J.A. (1992).

Inhibition of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase activity by binding of (2-azido-)ADP to a slowly exchangeable non-catalytic nucleotide binding site.

*Biochim. Biophys. Acta*, **1100**, 329 - 338.

Einarsdottir, O. (1995).

Fast reactions of cytochrome c oxidase.

*Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 129 - 147.

- Engwall, E. and Perlmann, P. (1971).  
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulinG.  
*Immunochem.*, **8**, 871 - 874.
- Ewart, G.D., Zhang, Y.-Z. and Capaldi, R.A. (1991).  
Switching of bovine cytochrome c oxidase subunit VIa isoforms in skeletal muscle during development.  
*FEBS Lett.*, **292**, 79 - 84.
- Ferguson-Miller, S., Bratigan, D.L. and Margoliash, E. (1976).  
Correlation of the kinetics of electron transfer activity of various eukaryotic cytochromes c with binding to mitochondrial cytochrome c oxidase.  
*J. Biol. Chem.*, **251**, 1104 - 1115.
- Ferguson-Miller, S., Brautigan, D.L. and Margoliash, E. (1978).  
Definition of cytochrome binding domains by chemical modification.  
*J. Biol. Chem.*, **253**, 149 - 159.
- Frank, V. and Kadenbach, B. (1996).  
Regulation of the  $H^+/e^-$  stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios.  
*FEBS Lett.*, **382**, 121 - 124.
- Frank, V., (1997).  
Regulation der Effizienz der Energietransduktion der Cytochrom c Oxidase durch Bindung von Nukleotiden an die Untereinheit VIa.  
*Dissertation, FB Chemie, Phillips - Universität Marburg.*
- Freund, R. and Kadenbach, B. (1994).  
Identification of tissue specific isoforms for subunit Vb and VIIa of cytochrome c oxidase isolated from rainbow trout.  
*Eur. J. Biochem.*, **221**, 1111 - 1116.
- Grossman, L. I. and Lomax, M.I. (1997).  
Nuclear genes for cytochrome c oxidase.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1352**, 174 - 192.

- Hakvoort, T.B.M., Moolenaar, K., Lankvelt, A.H.M., Sinjorgo, K.M.C., Dekker, H.L. and Muijsers, A.O. (1987).  
Separation, stability and kinetics of monomeric and dimeric bovine heart cytochrome c oxidase.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **894**, 347 - 354.
- Haltia, T., Saraste, M. and Wikström, M. (1982).  
Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: A site-directed mutagenesis study.  
*EMBO J.*, **10**, 2015 - 2021.
- Härd, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlmann, K., Freedman, L.P., Carlstedt - Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafsson, J.-A. and Kaptein, R. (1990).  
Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA - binding domain.  
*Science*, **249**, 157 - 160.
- Hiratsuka, T. (1985).  
A chromatophoric and fluorescent analog of GTP, 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrocyclohexadienylidene)-GTP, as a spectroscopic probe for the GTP inhibitory site of liver glutamate dehydrogenase.  
*J. Biol. Chem.*, **260**, 4784 - 4790.
- Hosler, J.P., Shapleigh, J.P., Mitchel, D.M., Kim, Y., Pressler, M.A., Georgiou, C., Babcock, G.T., Alben, J.O., Ferguson-Miller, S. and Gennis, R.B. (1996).  
Polar residues in helix VIII of subunit I of cytochrome c oxidase influence the activity and the structure of the active site.  
*Biochemistry*, **35**, 10776 - 10783.
- Hu, P.-S., Persson, B., Höög, J.-O., Jörnvall, H., Hartog, A.F., Berden, J.A., Holmberg, E. and Rydström, J. (1992).  
Energy-linked transhydrogenase. Characterization of a nucleotide-binding sequence in nicotinamide transhydrogenase from beef heart.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1102**, 19 - 29.
- Huang, S.-G. and Klingenberg, M. (1995).  
Nature of the masking of nucleotide-binding sites in brown adipose tissue mitochondria. Involvement of endogenous adenosine triphosphate.  
*Eur. J. Biochem.*, **229**, 718 - 725.

Hüther, F.-J., (1987).

Regulation der Rinderherz-C-Oxidase durch Adenosindiphosphat und Adenosintriphosphat.

*Dissertation, FB Chemie, Phillips - Universität Marburg.*

Hüther, F.-J. and Kadenbach, B. (1987).

ADP increases the affinity for cytochrome c by interaction with the matrix side of bovine heart cytochrome c oxidase.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1268 - 1275.

Hüther, F.-J., Berden, J. and Kadenbach, B. (1988).

Influence of 8-Azido-ATP and other anions on the activity of cytochrome c oxidase.

*J. Bioenerg. Biomemb.*, **20**, 503 - 516.

Hüttemann, M., Exner, S., Arnold, S., Lottspeich, F and Kadenbach, B. (1997).

The cDNA sequences of cytochrome c oxidase subunit VIa from carp and rainbow trout suggest the absence of isoforms in fishes.

*Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 14 - 18.

Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. and Michel, H. (1995).

Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*.

*Nature*, **376**, 660 - 669.

Jacobs, E.E., Andrews, E.C., Cunningham, W. and Crane, F.L. (1966).

Membraneous cytochrome oxidase preparation-purification, properties and reaction characteristics.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 87 - 94.

Kadenbach, B. (1966).

Der Einfluß von Thyroidhormonen in vivo auf die oxidative Phosphorylierung und die Enzymaktivität in Mitochondrien.

*Biochem. Z.*, **344**, 49 - 75.

Kadenbach, B. and Merle, P. (1981).

On the function of multiple subunits of cytochrome c oxidase from higher eukaryotes.

*FEBS lett.*, **135**, 1 - 11.

- Kadenbach, B. (1983).  
Structure and evolution of the Atmungsferment cytochrome c oxidase.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **22**, 275 - 285.
- Kadenbach, B., Jarausch, J., Hartmann, R. and Merle, P. (1983).  
Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis procedure.  
*Anal. Biochem.*, **129**, 517 - 521.
- Kadenbach, B. (1986).  
Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organism: Hypothesis.  
*J. Bioenerg. Biomembr.*, **18**, 39 - 54.
- Kadenbach, B., Stroh, A., Ungibauer, M., Kuhn-Nentwig, L., Büge, U. and Jarausch, J. (1986).  
Isoenzymes of cytochrome c oxidase: characterization and isolation from different tissues.  
*Methods Enzymol.*, **126**, 32 - 45.
- Kadenbach, B., Kuhn-Nentwig, L. and Büge, U. (1987).  
Evolution of a regulatory enzyme: Cytochrome c oxidase (complex IV).  
*Curr. Top. Bioenerg.*, **15**, 113 - 161.
- Kadenbach, B., Stroh, A., Hüther, F.-J., Reimann, A., Steverding, D. (1991).  
Evolutionary aspects of cytochrome c oxidase.  
*J. Bioenerg. Biomembr.*, **23**, 321 - 334.
- Kadenbach, B., Barth, J., Akgün, R., Freund, R., Linder, D. and Possekel, S. (1995).  
Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1271**, 103 - 109.
- Kawaga, Y. and Racker, E. (1971).  
Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation.  
*J. Biol. Chem.*, **256**, 5477 - 5487.

Lämmli, U.K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

*Nature*, **227**, 680 - 685.

LaMarche, A.E.P., Abate, M.I., Chan, S.H.P. and Trumpower, B.L. (1992).

Isolation and characterization of COX 12, the nuclear gene for a previously unrecognized subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase.

*J. Biol. Chem.*, **267**, 22473 - 22480.

Lin, J., Wu, S. and Chan, S.I. (1995).

Electron transfer from cytochrome c to 8-azido-ATP-modified cytochrome c oxidase.

*Biochemistry*, **34**, 6335 - 6343.

Lin, J., Wu, S., Lau, W. and Chan, S.I. (1995b).

8-Azido-ATP modification of cytochrome c: Retardation of its electron-transfer activity to cytochrome c oxidase.

*Biochemistry*, **34**, 2678 - 2685.

Linder, D., Freund, R. and Kadenbach, B. (1995).

Species-specific expression of cytochrome c oxidase isozymes.

*Comp. Biochem. Physiol.*, **B 112**, 461 - 469.

Margoliash, E., Barlow, G.H. and Byers, V. (1970).

Different binding properties of cytochrome c: Possible relevance for mitochondrial ion transport.

*Nature*, **228**, 723 - 726.

McIntosh, D.B., Parrish, J.C. and Wallace, J.A. (1996).

Definition of a nucleotide binding site on cytochrome c by photoaffinity labeling.

*J. Biol. Chem.*, **271**, 18379 - 18396.

Mell, O., Seibel, P. and Kadenbach, B. (1994).

Structural organization of the rat genes encoding liver - and heart - type of cytochrome c oxidase subunit VIa and a pseudogene related to COXVIa-L cDNA.

*Gene*, **140**, 179 - 186.

- Merle, P., Jarausch, J., Trapp, M., Scherka, R. and Kadenbach, B. (1981).  
Immunological and chemical characterization of rat liver cytochrome c oxidase.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **669**, 222 - 230.
- Merle, P. and Kadenbach, B. (1982).  
Kinetic and structural differences between cytochrome c oxidases from beef liver and heart.  
*Eur. J. Biochem.*, **125**, 239 - 244.
- Montecucco, C., Schiavo, G. and Bisson, R. (1986).  
ATP binding to bovine heart cytochrome c oxidase. A photoaffinity labelling study.  
*Biochem. J.*, **234**, 241 - 243.
- Müller, M., Thelen, M., O'Shea, P. and Azzi, A. (1986).  
Functional reconstitution of proton pumping cytochrome c oxidase in phospholipid vesicles.  
*Methods Enzymol.*, **126**, 78 - 87.
- Nakamoto, R.K. and Inesi, G. (1984).  
Studies of the interactions of 2',3'-O-(2,4,6 Trinitrohexyldienyliden) adenosine nucleotides with the saoplasmic reticulum ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase active site.  
*J. Biol. Chem.*, **259**, 2961 - 2970.
- Napiwotzki, J., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. and Kadenbach, B. (1997).  
ATP and ADP bind to cytochrome c oxidase and regulate its activity.  
*Biol. J.*, **378**, 1013 - 1021.
- Olausson, T., Hultman, T., Holmberg, E., Rydström, J., Ahmad, S., Glavas, N.A. and Bragg, P.D. (1993).  
Site-directed mutagenesis of tyrosine residues at nicotinamide nucleotide binding sites of *Escherichia coli* transhydrogenase.  
*Biochemistry*, **32**, 13237 - 13244.
- Papa, S., Capitanio, N. and De Nitto, E. (1987).  
Characteristics of the redox-linked proton ejection in beef-heart cytochrome c oxidase reconstituted in liposomes.  
*Eur. J. Biochem.*, **164**, 507 - 516.

- Papa, S., Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E. and Minuto, M. (1991).  
The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable  $H^+/e^-$  stoichiometry.  
*FEBS lett.*, **208**, 183 - 186.
- Penttilä, T. (1983).  
Properties and reconstitution of a cytochrome oxidase deficient in subunit III.  
*Eur. J. Biochem.*, **133**, 355 - 361.
- Planques, Y., Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E., Villani, G. and Papa, S. (1989).  
Role of supernumerary subunits in mitochondrial cytochrome c oxidase.  
*FEBS lett.*, **258**, 285 - 288.
- Poyton, R.O. and Burke, P.V. (1992).  
Oxygen regulated transcription of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1101**, 252 - 256.
- Prieto, S., Bouillard, F. and Rial, E. (1995).  
The mechanism for the ATP - induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Biochem. J.*, **307**, 657 - 661.
- Prochaska, L.J. and Fink, P.S. (1987).  
On the role of subunit III in proton translocation in cytochrome c oxidase.  
*J. Bioenerg, Biomembr.*, **19**, 143 - 166.
- Prowse, P.L. and Jenkin, C.R. (1978).  
Isolation of pure IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub> immunoglobulins from mouse serum using Protein A-sepharose.  
*Immunochemistry*, **15**, 429 - 436.
- Puettner, I., Carafoli, E. and Malatesta, F. (1985).  
Spectroscopic and functional properties of subunit III - depleted cytochrome oxidase.  
*J. Biol. Chem.*, **260**, 3719 - 3723.



- Reimann, A., Hüther, F.-J., Berden, J.A., and Kadenbach, B. (1988).  
Anions induce conformational changes and influence the activity and photoaffinity-labelling by 8-Azido-ATP of isolated cytochrome c oxidase.  
*Biochem. J.*, **254**, 723 - 730.
- Reimann, A. (1991).  
Regulation der Kinetik und Energietransduktion der Cytochrom c Oxidase.  
Untersuchung unter Verwendung chemisch modifizierter Nukleotide.  
*Dissertation, FB Chemie, Phillips - Universität Marburg.*
- Reimann, A. and Kadenbach, B. (1992).  
Stoichiometric binding of 2'(or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine-5'-triphosphate to bovine heart cytochrome c oxidase.  
*FEBS lett.*, **307**, 294 - 296.
- Rieger, T. (1995).  
Untersuchung der Interaktion von ATP mit der Cytochrom c Oxidase und Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Domänen von Cytochrom c Oxidase Untereinheiten.  
*Dissertation, FB Chemie, Phillips - Universität Marburg.*
- Rieger, T., Napiwotzki, J., Hüther, F.-J. and Kadenbach, B. (1995).  
The number of nucleotide binding sites in cytochrome c oxidase.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217 (1)**, 34 - 40.
- Rigoulet, M., Guerin, B. and Dennis, M. (1987).  
Modification of flow-force relationships by external ATP in yeast mitochondria.  
*Eur. J. Biochem.*, **168**, 275 - 279.
- Rizzuto, R., Nakase, H., Darras, B., Franck, U., Fabrizi, G.M., Mengel, T., Walsh, F., Kadenbach, B., DiMauro, S. and Schon, E.A. (1989).  
A gene specifying subunit VIII of human cytochrome c oxidase is localized to chromosome II and is expressed in both muscle and non-muscle tissues.  
*J. Biol. Chem.*, **264**, 10595 - 10600.

- Rizzuto, R., Sandona, D., Capaldi, R.A. and Bisson, R. (1991).  
Characterization of a cDNA encoding VI of cytochrome c oxidase from the  
slime mold *Dictyostelium discoideum*.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1089**, 386 - 388.
- Robert, H., and Hess, B. (1977).  
Kinetics of cytochrome c oxidase from yeast.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **462**, 215 - 234.
- Rohdich, F. and Kadenbach, B. (1993).  
Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase efficiency by nucleotides.  
*Biochemistry*, **32**, 8499 - 8503.
- Saraste, M., Penttilä, T. and Wikström, M. (1981).  
Quaternary structure of bovine cytochrome oxidase.  
*Eur. J. Biochem.*, **115**, 261 - 268.
- Saraste, M. (1990).  
Structural features of cytochrome c oxidase.  
*Q. Rev. Biophys.*, **23**, 331 - 366.
- Sarti, P., Jones, M.G., Antonini, G., Malatesta, F., Colosimo, A., Wilson, M.T. and  
Brunori, M. (1985).  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4876 - 4880.
- Schiavo, G. and Bisson, R. (1989).  
Oxygen influences the subunit structure of cytochrome c oxidase in the slime  
mold *Dictyostelium discoideum*.  
*J. Biol. Chem.*, **264**, 7129 - 7134.
- Schneyder, B. (1990).  
Herstellung, Charakterisierung und Anwendung monoklonaler Antikörper  
gegen die Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase.  
*Dissertation FB Biologie, Phillips - Universität Marburg*.
- Schneyder, B., Mell, O., Anthony, G. and Kadenbach, B., (1991).  
Cross reactivity of monoclonal antibodies and cDNA suggest evolutionary  
relationship between subunits VIIa und VIIb.  
*Eur. J. Biochem.*, **198**, 85 - 92.

- Schwenke, W.B., Soboll, S., Seitz, H.J. and Sies, H. (1981).  
Mitochondrial and cytosolic ATP/ADP - ratios in rat liver in vivo.  
*Biochem. J.*, **200**, 405 - 408.
- Seelan, R.S. and Grossman, L. (1991).  
Cytochrome c oxidase subunit VIIa isoforms.  
*J. Biol. Chem.*, **266**, 19752 - 19757.
- Segade, F., Hurle, B., Claudio, E., Ramos, S. and Lazo, P.S. (1996).  
Identification of an additional member of the cytochrome c oxidase subunit VIIa family of proteins.  
*J. Biol. Chem.*, **271**, 12343 - 12349.
- Smith, A.L. (1967).  
Preparations, properties and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material, small scale.  
*Methods Enzymol.*, **10**, 81 - 86.
- Solioz, M., Carafoli, E. and Ludwig, B. (1982).  
The cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans* pumps protons in a reconstituted system.  
*J. Biol. Chem.*, **257**, 1579 - 1582.
- Speijer, D., Breek, C.K.D., Muijsers, A.O., Groeneveldt, P.X., Dekker, H., de Haan, A. and Benne, R. (1996).  
The sequence of a small subunit of cytochrome c oxidase from *Critidia fasciculata* which is homologous to mammalian subunit IV.  
*FEBS lett.*, **381**, 123 - 126.
- Suarez, M.D., Revzin, A., Narlock, R., Kempner, E.S., Thompson, D.A. and Ferguson-Miller, S. (1984).  
The functional and physical form of mammalian cytochrome c oxidase determined by gel filtration, radiation inactivation, and sedimentation equilibrium analysis.  
*J. Biol. Chem.*, **259**, 13791 - 13799.

Taanman, J.-W. and Capaldi, R.A. (1992).

Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme.

*J. Biol. Chem.*, **267**, 22481 - 22485.

Taanman, J.-W., Herzberg, N.H., De Vries, H., Bolhuis, P.A. and Van den Bogert, C. (1992).

Steady - state transcript levels of cytochrome c oxidase genes during human myogenesis indicate subunit switching of subunit VIa and co-expression of subunit VIIa isoforms.

*Biochim. Biophys. Acta*, **1139**, 155 - 162.

Taanman, J.-W., Turina, P. and Capaldi, R.A. (1994).

Regulation of cytochrome c oxidase by interaction of ATP at two binding sites, one on Subunit VIa.

*Biochemistry*, **33**, 11833 - 11841.

Taha, T.S.M. and Ferguson - Miller, S. (1992).

Interaction of cytochrome c with cytochrome c oxidase studied by monoclonal antibodies and a protein modifying reagent.

*Biochemistry*, **31**, 9090 - 9097.

Thomas, J.W., Lemieux, L.J., Alben, J.O. and Gennis, R.B. (1993).

Site-directed mutagenesis of highly conserved residues in helix VIII of subunit I of the cytochrom bo ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*: An amphipatic transmembrane helix that may be important in conveying protons to the binuclear center.

*Biochemistry*, **32**, 11173 - 11180.

Thomas, J.W., Puustinen, A., Alben, J.O., Gennis, R.B. and Wikström, M. (1993b).

Substitution of asparagin for aspartate-135 in subunit I of cytochrome bo ubiquinol oxidase of *escherichia coli* eliminates proton pump activity.

*Biochemistry*, **32**, 10923 - 10928.

Thompson, D.A., Suarez-Villafane, M. and Ferguson-Miller, S. (1982).

The active form of cytochrome c oxidase: Effects of detergent, the intact membrane and radiation inactivation.

*Biophys. J.*, **37**, 285 - 292.

- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, **269**, 1069 - 1074.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-Subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, **272**, 1136 - 1144.
- Van Gelder, B.F. and Slater, E.C. (1962). *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 593 - 595.
- Veech, R.L., Lawson, J.W.R., Cornell, N.W. and Krebs, H.A. (1979). Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.*, **254**, 6538 - 6547.
- Von Jagow, G. and Klingenberg, M. (1972). Close correlation between antimycin titer and cytochrome bc<sub>1</sub> content in mitochondria of chloramphenicol treated *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.*, **24**, 278 - 282.
- Von Jagow, G. and Engel, E.D. (1980). Struktur und Funktion des energieumwandelnden Systems der Mitochondrien. *Angew. Chem.*, **92**, 684 - 700.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the α- and β-subunit of ATP-synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945 - 951.
- Wallace, D.C., Ye, J., Neckelmann, S.N., Singh, G., Webster, K.A. and Greenberg, B.D. (1987). *Curr. Genet.*, **12**, 81 - 90.

- Wan, B. and Moreadith, R.W. (1995).  
Structural characterization and regulatory element analysis of the heart isoform of cytochrome c oxidase VIa.  
*J. Biol. Chem.*, **270**, 26433 - 26440.
- Weishaupt, A. and Kadenbach, B. (1992).  
Selective Removal of Subunit VIb Increases the Activity of Cytochrome c Oxidase.  
*Biochemistry*, **31**, 11477 - 11481.
- Wikström, M., Krab, K. and Saraste, M. (1981).  
Cytochrome c Oxidase - A Synthesis.  
*Academic Press*, New York, USA.
- Yamaguchi, M. and Hatefi, Y. (1995).  
Proton-translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase.  
*J. Biol. Chem.*, **270**, 28165 - 28168.
- Yoshikawa, S., Choc, M.G., O'Toole, M.C. and Caughey, W.S. (1977).  
An infrared study of CO binding to heart cytochrome c oxidase and hemoglobin A.  
*J. Biol. Chem.*, **252**, 5498 - 5508.
- Yoshikawa, S., Tera, T., Takahashi, Y. and Tsukihara, T. (1988).  
Crystalline cytochrome c oxidase of bovine heart mitochondrial membrane: composition and x-ray diffraction studies.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1354 - 1358.
- Zhang, Y.-Z., Ewart, G. and Capaldi, R.A. (1991).  
Topology of subunits of the mammalian cytochrome c oxidase: Relationship to the assembly of the enzyme complex.  
*Biochemistry*, **30**, 3674 - 3681.

## Anhang A: Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azin-di(3-ethyl-benzthiazolin-schwefelsäure)-diammoniumsalz
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
CCCP	Carbonylcyanid - m - chlorophenylhydrazon
COX	Cytochrom c Oxidase
DEAE	Diethylaminoethyl
E	Extinktion
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)Piperacin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
Ig	Immunglobulin
$K_d$	Dissoziationskonstante
$k_{eff}$	Katalytische Effektivität
$K_M$	Michaelis - Menten - Konstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS - PAGE	SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TMPD	
TNP-ATP	2'(3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosintriphosphat
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
$V_{Max}$	Maximalgeschwindigkeit

```

rem ***** Homology *****
rem *   Programm zur Suche nach strukturelle Homologien innerhalb der COX *
rem *
rem *           geschrieben von Jörg Napiwotzki
rem *           vom 19.7. - 21.7.1997
rem *****

DIM protein(26, 6)      : Rem Aminosäureeigenschaften
DIM feldpunkte(400, 4) : rem zur Zwischenspeicherung für gefundene Homologien
DIM text$(13)
DIM sulen(13)           : rem Feld für Länge der Untereinheiten
DIM seq(13, 514)        : rem Feld für die Aminosäuresequenz der Untereinheiten

CLS
sulen(1) = 514: text$(1) = "Untereinheit I  "
sulen(2) = 227: text$(2) = "Untereinheit II "
sulen(3) = 261: text$(3) = "Untereinheit III "
sulen(4) = 147: text$(4) = "Untereinheit IV  "
sulen(5) = 109: text$(5) = "Untereinheit Va  "
sulen(6) = 98: text$(6) = "Untereinheit Vb  "
sulen(7) = 84: text$(7) = "Untereinheit VIa  "
sulen(8) = 85: text$(8) = "Untereinheit VIb  "
sulen(9) = 73: text$(9) = "Untereinheit VIc  "
sulen(10) = 59: text$(10) = "Untereinheit VIIa "
sulen(11) = 56: text$(11) = "Untereinheit VIIb "
sulen(12) = 47: text$(12) = "Untereinheit VIIc "
sulen(13) = 46: text$(13) = "Untereinheit VIII "

REM Initialisierung der Aminosaeuren (Einlesen der Eigenschaften)
FOR nr = 1 TO 25
    FOR eigenschaft = 1 TO 6
        READ a
        protein(nr, eigenschaft) = a
    NEXT eigenschaft
NEXT nr

rem Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren
rem 1. Ziffer = Ladung (1 = negativ, 5 = neutral, 9 = positiv)
rem 2. Ziffer = helixbildende Eigenschaften (1 = sehr schwach 3 = schwach
rem          5 = neutral 7 = stark 9 = sehr stark)
rem 3. Ziffer = faltblattbildende Eigenschaften (1 = sehr schwach 3 = schwach
rem          5 = neutral 7 = stark 9 = sehr stark)
rem 4. Ziffer = polare Reste (1 = hydrophob 5 = nur polar
rem          7 = nur Elektronendonator oder -akzeptor
rem          9 = sowohl Elektronendonator oder -akzeptor
rem 5. Ziffer = Aromatischer Rest (9 = ja 1 = nein)
rem          Histidin = 3 da konjugierte Doppelbindung
rem 6. Ziffer = Restlänge (Glycin = 0)

DATA 5,9,5,1,1,1 : REM Alanin
DATA 0,0,0,0,0,0 : REM -
DATA 5,5,7,9,1,2 : REM Cystein
DATA 1,5,1,7,1,4 : REM Asparaginsaeure
DATA 1,9,1,7,1,5 : REM Glutamat
DATA 5,7,7,1,9,7 : REM Phenylalanin
DATA 5,1,3,5,1,0 : REM Glycin
DATA 5,5,5,9,3,6 : REM Histidin
DATA 5,7,9,1,1,4 : REM Isoleucin
DATA 0,0,0,0,0,0 : REM -
DATA 9,7,3,7,1,5 : REM Lysin
DATA 5,9,7,1,1,4 : REM Leucin

```



```

DATA 5,9,7,5,1,4 : REM Methionin
DATA 5,3,5,9,1,4 : REM Asparagin
DATA 0,0,0,0,0,0 : REM -
DATA 5,1,1,1,1,3 : REM Prolin
DATA 5,7,7,9,1,5 : REM Glutamin
DATA 9,5,5,9,1,7 : REM Arginin
DATA 5,5,3,9,1,2 : REM Serin
DATA 5,5,7,9,1,3 : REM Threonin
DATA 0,0,0,0,0,0 : REM -
DATA 5,7,9,1,1,3 : REM Valin
DATA 5,7,7,9,9,9 : REM Tryptophan
DATA 0,0,0,0,0,0 : REM -
DATA 5,3,9,9,9,8 : REM Tyrosin

```

```

REM Initialisierung der Sequenzen
FOR x = 1 TO 13
  FOR nr = 1 TO sulen(x)
    READ code$
    c1 = ASC(code$) - 64
    seq(x, nr) = c1
  NEXT nr
NEXT x

```

```

REM Untereinheit I
DATA M,F,I,N,R,W,L,F,S,T,N,H,K
DATA D,I,G,T,L,Y,L,L,F,G,A,W,A
DATA G,M,V,G,T,A,L,S,L,L,I,R,A
DATA E,L,G,Q,P,G,T,L,L,G,D,D,Q
DATA I,Y,N,V,V,V,T,A,H,A,F,V,M
DATA I,F,F,M,V,M,P,I,M,I,G,G,F
DATA G,N,W,L,V,P,L,M,I,G,A,P,D
DATA M,A,F,P,R,M,N,N,M,S,F,W,L
DATA L,P,P,S,F,L,L,L,A,S,S,M
DATA V,E,A,G,A,G,T,G,W,T,V,Y,P
DATA P,L,A,G,N,L,A,H,A,G,A,S,V
DATA D,L,T,I,F,S,L,H,L,A,G,V,S
DATA S,I,L,G,A,I,N,F,I,T,T,I,I
DATA N,M,K,P,P,A,M,S,Q,Y,Q,T,P
DATA L,F,V,W,S,V,M,I,T,A,V,L,L
DATA L,L,S,L,P,V,L,A,A,G,I,T,M
DATA L,L,T,D,R,N,L,N,T,T,F,F,D
DATA P,A,G,G,G,D,P,I,L,Y,Q,H,L
DATA F,W,F,F,G,H,P,E,V,Y,I,L,I
DATA L,P,G,F,G,M,I,S,H,I,V,T,Y
DATA Y,S,G,K,K,E,P,F,G,Y,M,G,M
DATA V,W,A,M,M,S,I,G,F,L,G,F,I
DATA V,W,A,H,H,M,F,T,V,G,M,D,V
DATA D,T,R,A,Y,F,T,S,A,T,M,I,I
DATA A,I,P,T,G,V,K,V,F,S,W,L,A
DATA T,L,H,G,G,N,I,K,W,S,P,A,M
DATA M,W,A,L,G,F,I,F,L,F,T,V,G
DATA G,L,T,G,I,V,L,A,N,S,S,L,D
DATA I,V,L,H,D,T,Y,Y,V,V,A,H,F
DATA H,Y,V,L,S,M,G,A,V,F,A,I,M
DATA G,G,F,V,H,W,F,P,L,F,S,G,Y
DATA T,L,N,D,T,W,A,K,I,H,F,A,I
DATA M,F,V,G,V,N,M,T,F,F,P,Q,H
DATA F,L,G,L,S,G,M,P,R,R,Y,S,D
DATA Y,P,D,A,Y,T,M,W,N,T,I,S,S
DATA M,G,S,F,I,S,L,T,A,V,M,L,M
DATA V,F,I,I,W,E,A,F,A,S,K,R,E

```

DATA V,L,T,V,D,L,T,T,T,N,L,E,W  
 DATA L,N,G,C,P,P,P,Y,H,T,F,E,E  
 DATA P,T,Y,V,N,L,K

## REM Untereinheit II

DATA M,A,Y,P,M,Q,L,G,F,Q,D,A,T  
 DATA S,P,I,M,E,E,L,L,H,F,H,D,H  
 DATA T,L,M,I,V,F,L,I,S,S,L,V,L  
 DATA Y,I,I,S,L,M,L,T,T,K,L,T,H  
 DATA T,S,T,M,D,A,Q,E,V,E,T,I,W  
 DATA T,I,L,P,A,I,I,L,I,L,I,A,L  
 DATA P,S,L,R,I,L,Y,M,M,D,E,I,N  
 DATA N,P,S,L,T,V,K,T,M,G,H,Q,W  
 DATA Y,W,S,Y,E,Y,T,D,Y,E,D,L,S  
 DATA F,D,S,Y,M,I,P,T,S,E,L,K,P  
 DATA G,E,L,R,L,L,E,V,D,N,R,V,V  
 DATA L,P,M,E,M,T,I,R,M,L,V,S,S  
 DATA E,D,V,L,H,S,W,A,V,P,S,L,G  
 DATA L,K,T,D,A,I,P,G,R,L,N,Q,T  
 DATA T,L,M,S,S,R,P,G,L,Y,Y,G,Q  
 DATA C,S,E,I,C,G,S,N,H,S,F,M,P  
 DATA I,V,L,E,L,V,P,L,K,Y,F,E,K  
 DATA W,S,A,S,M,L

## REM Untereinheit III

DATA M,T,H,Q,T,H,A,Y,H,M,V,N,P  
 DATA S,P,W,P,L,T,G,A,L,S,A,L,L  
 DATA M,T,S,G,L,T,M,W,F,H,F,N,S  
 DATA M,T,L,L,M,I,G,L,T,T,N,M,L  
 DATA T,M,Y,Q,W,W,R,D,V,I,R,E,S  
 DATA T,F,Q,G,H,H,T,P,A,V,Q,K,G  
 DATA L,R,Y,G,M,I,L,F,I,I,S,E,V  
 DATA L,F,F,T,G,F,F,W,A,F,Y,H,S  
 DATA S,L,A,P,T,P,E,L,G,G,C,W,P  
 DATA P,T,G,I,H,P,L,N,P,L,E,V,P  
 DATA L,L,N,T,S,V,L,L,A,S,G,V,S  
 DATA I,T,W,A,H,H,S,L,M,E,G,D,R  
 DATA K,H,M,L,Q,A,L,F,I,T,I,T,L  
 DATA G,V,Y,F,T,L,L,Q,A,S,E,Y,Y  
 DATA E,A,P,F,T,I,S,D,G,V,Y,G,S  
 DATA T,F,F,V,A,T,G,F,H,G,L,H,V  
 DATA I,I,G,S,T,F,L,I,V,C,F,F,R  
 DATA Q,L,K,F,H,F,T,S,N,H,H,F,G  
 DATA F,E,A,G,A,W,Y,W,H,F,V,D,V  
 DATA V,W,L,F,L,Y,V,S,I,Y,W,W,G  
 DATA S

## REM Untereinheit IV

DATA A,H,G,S,V,V,K,S,E,D,Y,A,L  
 DATA P,S,Y,V,D,R,R,D,Y,P,L,P,D  
 DATA V,A,H,V,K,N,L,S,A,S,Q,K,A  
 DATA L,K,E,K,E,K,A,S,W,S,S,L,S  
 DATA I,D,E,K,V,E,L,Y,R,L,K,F,K  
 DATA E,S,F,A,E,M,N,R,S,T,N,E,W  
 DATA K,T,V,V,G,A,A,M,F,F,I,G,F  
 DATA T,A,L,L,L,I,W,E,K,H,Y,V,Y  
 DATA G,P,I,P,H,T,F,E,E,E,W,V,A  
 DATA K,Q,T,K,R,M,L,D,M,K,V,A,P  
 DATA I,Q,G,F,S,A,K,W,D,Y,D,K,N  
 DATA E,W,K,K

## REM Untereinheit Va

DATA S,H,G,S,H,E,T,D,E,E,F,D,A  
 DATA R,W,V,T,Y,F,N,K,P,D,I,D,A  
 DATA W,E,L,R,K,G,M,N,T,L,V,G,Y  
 DATA D,L,V,P,E,P,K,I,I,D,A,A,L  
 DATA R,A,C,R,R,L,N,D,F,A,S,A,V  
 DATA R,I,L,E,V,V,K,D,K,A,G,P,H  
 DATA K,E,I,Y,P,Y,V,I,Q,E,L,R,P  
 DATA T,L,N,E,L,G,I,S,T,P,E,E,L  
 DATA G,L,D,K,V

## REM Untereinheit Vb

DATA A,S,G,G,G,V,P,T,D,E,E,Q,A  
 DATA T,G,L,E,R,E,V,M,L,A,A,R,K  
 DATA G,Q,D,P,Y,N,I,L,A,P,K,A,T  
 DATA S,G,T,K,E,D,P,N,L,V,P,S,I  
 DATA T,N,K,R,I,V,G,C,I,C,E,E,D  
 DATA N,S,T,V,I,W,F,W,L,H,K,G,E  
 DATA A,Q,R,C,P,S,C,G,T,H,Y,K,L  
 DATA V,P,H,Q,L,A,H

## REM Untereinheit VIa

DATA A,S,A,A,K,G,D,H,G,G,T,G,A  
 DATA R,T,W,R,F,L,T,F,G,L,A,L,P  
 DATA S,V,A,L,C,T,L,N,S,W,L,H,S  
 DATA G,H,R,E,R,P,A,F,I,P,Y,H,H  
 DATA L,R,I,R,T,K,P,F,S,W,G,D,G  
 DATA N,H,T,F,F,H,N,P,R,V,N,P,L  
 DATA P,T,G,Y,E,K

## REM Untereinheit VIb

DATA A,E,D,I,Q,A,K,I,K,N,Y,Q,T  
 DATA A,P,F,D,S,R,F,P,N,Q,N,Q,T  
 DATA R,N,C,W,Q,N,Y,L,D,F,H,R,C  
 DATA E,K,A,M,T,A,K,G,G,D,V,S,V  
 DATA C,E,W,Y,R,R,V,Y,K,S,L,C,P  
 DATA I,S,W,V,S,T,W,D,D,R,R,A,E  
 DATA G,T,F,P,G,K,I

## REM Untereinheit VIc

DATA S,T,A,L,A,K,P,Q,M,R,G,L,L  
 DATA A,R,R,L,R,F,H,I,V,G,A,F,M  
 DATA V,S,L,G,F,A,T,F,Y,K,F,A,V  
 DATA A,E,K,R,K,K,A,Y,A,D,F,Y,R  
 DATA N,Y,D,S,M,K,D,F,E,E,M,R,K  
 DATA A,G,I,F,Q,S,A,K

## REM Untereinheit VIIa

DATA F,E,N,R,V,A,E,K,Q,K,L,F,Q  
 DATA E,D,N,G,L,P,V,H,L,K,G,G,A  
 DATA T,D,N,I,L,Y,R,V,T,M,T,L,C  
 DATA L,G,G,T,L,Y,S,L,Y,C,L,G,W  
 DATA A,S,F,P,H,K,K

## REM Untereinheit VIIb

DATA I,H,Q,K,R,A,P,D,F,H,D,K,Y  
 DATA G,N,A,V,L,A,S,G,A,T,F,C,V  
 DATA A,V,W,V,Y,M,A,T,Q,I,G,I,E  
 DATA W,N,P,S,P,V,G,R,V,T,P,K,E  
 DATA W,R,E,Q

```

REM Untereinheit VIIc
DATA S,H,Y,E,E,G,P,G,K,N,I,P,F
DATA S,V,E,N,K,W,R,L,L,A,M,M,T
DATA L,F,F,G,S,G,F,A,A,P,F,F,I
DATA V,R,H,Q,L,L,K,K

```

```

REM Untereinheit VIII
DATA I,T,A,K,P,A,K,T,P,T,S,P,K
DATA E,Q,A,I,G,L,S,V,T,F,L,S,F
DATA L,L,P,A,G,W,V,L,Y,H,L,D,N
DATA Y,K,K,S,S,A,A

```

```

datei$ = "ausgabe.dat" : rem Name der Ausgabedatei
OPEN datei$ FOR OUTPUT AS #1
REDIM kons$(20)          : rem Feld für die Konsensussequenzen
                          : rem (X = irgendeine Aminosäure)

```

```

kons$(1) = "GGYAKEM"
kons$(2) = "MEKAYGG"
kons$(3) = "GXGXXV"
kons$(4) = "VXXGXG"
kons$(5) = "GXGVAG"
kons$(6) = "GAVGXG"
kons$(7) = "GXGXXG"
kons$(8) = "GXXGXG"
kons$(9) = "GXGXXA"
kons$(10) = "AXXGXG"
kons$(11) = "GITPA"
kons$(12) = "APTIG"
kons$(13) = "GDGXXT"
kons$(14) = "TXXGDG"
kons$(15) = "KTXXXXXXV"
kons$(16) = "VXXXXXXTK"
kons$(17) = "KTXXXXXXI"
kons$(18) = "IXXXXXXTK"
kons$(19) = "GDGXXS"
kons$(20) = "SXXGDG"

```

```

rem Vergleich der Konsensussequenzen mit den Untereinheiten
FOR lauf = 1 TO 20
  a$ = kons$(lauf)
  anzahl = 0
  FOR ziffer = 1 TO 400
    feldpunkte(ziffer, 1) = 0
  NEXT ziffer
  laenge = LEN(a$)
  REDIM feld(laenge)

```

```

REM uebertragung der Konsensussequenz in Feld
minus = 0: REM Wieviele X
FOR buch = 1 TO laenge
  b$ = MID$(a$, buch, 1)
  code = ASC(b$)
  IF code > 96 THEN code = code - 32
  IF code < 64 THEN GOTO error1
  IF code > 90 THEN GOTO error1
  code = code - 64
  feld(buch) = code
  IF code = 24 THEN minus = minus + 1
error1:
NEXT buch

```

```

REM Berechnung der möglichen Punkte
REM Vergleich der Sequenz mit sich selbst
zusatz = 0
FOR nr2 = 1 TO laenge
  FOR vergl = 1 TO 6
    a1 = protein(feld(nr2), vergl)
    IF feld(nr2) = 24 THEN GOTO ende10
    zwischen = 0
    IF zwischen = 0 THEN
      zusatz = zusatz + 3
    END IF
    IF vergl = 1 THEN
      IF a1 = 9 THEN ladung = ladung + 1
      IF a1 = 1 THEN ladung = ladung - 1
      IF a1 <> 5 THEN
        zusatz = zusatz + 3
      END IF
    END IF
    IF vergl = 2 THEN
      IF zwischen < 3 THEN zusatz = zusatz + 1
    END IF
    IF vergl = 3 THEN
      IF zwischen < 3 THEN zusatz = zusatz + 1
    END IF
    IF vergl = 4 THEN
      IF zwischen < 3 THEN
        a1 = protein(feld(nr2), vergl)
        IF a1 = 9 THEN
          zusatz = zusatz + 3
        ELSEIF a1 <= 7 THEN
          zusatz = zusatz + 1
        END IF
      END IF
    END IF
    IF vergl = 5 THEN
      a1 = protein(feld(nr2), vergl)
      IF a1 = 9 THEN zusatz = zusatz + 1
    END IF
    IF vergl = 6 THEN
      IF zwischen < 3 THEN zusatz = zusatz + 1
    END IF
  ende10:
  NEXT vergl
NEXT nr2
maxzusatz = zusatz

```

```

REM Untersuchung der Sequenzen
nummer = 0
FOR x = 1 TO 13
  FOR nr1 = 1 TO sulen(x)
    LOCATE 15, 4: PRINT text$(x)
    LOCATE 19, 4: PRINT "Lauf : "; lauf
    punkte = 0
    zusatz = 0
    nummer = nummer + 1
    FOR nr2 = 1 TO laenge
      IF nr1 + laenge - 1 > sulen(x) THEN
        punkte = 20000
        punkte2 = 0
        GOTO ende1
      END IF
    END IF
  END IF

```

```

FOR vergl = 1 TO 6
  IF feld(nr2) <> 24 THEN
    a0 = protein(feld(nr2), vergl)
    zwischen = ABS(protein(feld(nr2), vergl) - protein(seq(x, nr1 + nr2 - 1), vergl))
    IF zwischen = 0 THEN
      zusatz = zusatz + 3
      IF vergl = 1 THEN zusatz = zusatz + 3
    END IF
    IF vergl = 1 AND a0 <> 5 THEN
      IF ladung > 0 AND a0 = 9 THEN
        zusatz = zusatz + 1
      ELSEIF ladung < 0 AND a0 = 1 THEN
        zusatz = zusatz + 1
      ELSEIF ladung < 0 AND a0 = 9 THEN
        zusatz = zusatz - 3
      ELSEIF ladung > 0 AND a0 = 1 THEN
        zusatz = zusatz - 3
      END IF
    END IF
    IF vergl = 2 THEN
      IF zwischen = 2 THEN zusatz = zusatz + 1
    END IF
    IF vergl = 3 THEN
      IF zwischen = 2 THEN zusatz = zusatz + 1
    END IF
    IF vergl = 4 THEN
      IF zwischen < 2 THEN
        a1 = protein(seq(x, nr1 + nr2 - 1), vergl)
        IF a1 = 9 THEN
          zusatz = zusatz + 3
        ELSEIF a1 <= 7 THEN
          zusatz = zusatz + 1
        END IF
      END IF
    END IF
    IF vergl = 5 THEN
      a1 = protein(seq(x, nr1 + nr2 - 1), vergl)
      IF a1 = 9 THEN zusatz = zusatz + 1
    END IF
    IF vergl = 6 THEN
      IF zwischen < 3 THEN zusatz = zusatz + 1
    END IF
  END IF
NEXT vergl
ende1:
NEXT nr2

noetig = maxzusatz * (19 - laenge + minus) / 20
IF zusatz < noetig THEN GOTO ohnewert

FOR ziffer = 1 TO 400
  IF zusatz > feldpunkte(ziffer, 1) THEN
    FOR ziffer2 = 399 TO ziffer STEP -1
      feldpunkte(ziffer2 + 1, 1) = feldpunkte(ziffer2, 1)
      feldpunkte(ziffer2 + 1, 2) = feldpunkte(ziffer2, 2)
      feldpunkte(ziffer2 + 1, 3) = feldpunkte(ziffer2, 3)
      feldpunkte(ziffer2 + 1, 4) = feldpunkte(ziffer2, 4)
    NEXT ziffer2
    feldpunkte(ziffer, 1) = zusatz
    feldpunkte(ziffer, 2) = nr1
    feldpunkte(ziffer, 3) = x
  
```

```

feldpunkte(ziffer, 4) = 100 * zusatz / maxzusatz
anzahl = anzahl + 1
punkte = 0
zusatz = 0
CLS
PRINT a$
PRINT
FOR ziffer2 = 1 TO 10
    beginn = feldpunkte(ziffer2, 2)
    sequenz$ = ""
    FOR ziffer3 = 0 TO laenge - 1
        sequenz$ = sequenz$+CHR$(seq(feldpunkte(ziffer2, 3),
beginn+ziffer3)+64)
    NEXT ziffer3
NEXT ziffer2
END IF
NEXT ziffer
ohnewert:
NEXT nr1
NEXT x

PRINT #1,
PRINT #1, "Untersuchte Konsensussequenz : "; a$
PRINT #1,
PRINT #1, "'Maximale' Punkte          : "; maxzusatz
PRINT #1,
PRINT #1, "Die besten "; anzahl; "šbereinstimmungen : "
PRINT #1,
IF anzahl > 400 THEN anzahl = 400
FOR ziffer = 1 TO anzahl
    beginn = feldpunkte(ziffer, 2)
    sequenz$ = ""
    FOR ziffer3 = 0 TO laenge - 1
        sequenz$ = sequenz$ + CHR$(seq(feldpunkte(ziffer, 3), beginn + ziffer3) + 64)
    NEXT ziffer3
    PRINT #1, ziffer, feldpunkte(ziffer, 2), feldpunkte(ziffer, 1), sequenz$, text$(feldpunkte(ziffer,
3)), feldpunkte(ziffer, 4)
NEXT ziffer
PRINT #1,
NEXT lauf
CLOSE #1

```

Herrn Prof. Dr. B. Kadenbach danke ich für die interessante Problemstellung, seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, daß ich meine Ideen sehr selbstständig entwickeln und durchführen konnte.

Herrn Prof. Dr. H. Kindl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachten zu dieser Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Thyssen-Stiftung und der Deutschen Forschung Gesellschaft.

Dem Arbeitskreis danke ich für die größtenteils angenehme und produktive Atmosphäre.

Petra Bernotat danke ich für die gründliche Durchführung eines Teils der Aktivitätsmessungen am löslichen Enzym.

Mein Dank gilt auch Theophil Rieger, dessen Vorarbeiten mit der Gleichgewichtsdialyse halfen Fehler zu vermeiden.

Insbesondere möchte ich mich bei Viola Frank bedanken, die in den vier Jahren meines Schaffens im Arbeitskreis Kadenbach mir die nahezu perfekte Kollegin gewesen ist und durch zahlreiche Diskussionen Anregungen für diese Arbeit gegeben hat. Auch für die gründliche und kritische Durchsicht des Manuskripts dieser Dissertation möchte ich mich bei ihr bedanken.

Wiebke Fricke danke ich für Interesse, Aufmunterung und Unterstützung während dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und immer für mich da sind.